

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MENCION NEUROCIENCIA

**EFFECTO DE LA REPROGRAMACIÓN NEONATAL CON HORMONAS SEXUALES SOBRE
EL CONTENIDO DE AMINAS BIOGÉNICAS Y LA EXPRESIÓN DE TIROSINA
HIDROXILASA EN SEPTUM LATERAL DE RATAS ADULTAS**

Felipe Véliz Valverde

Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director de Tesis:

Prof. Dr. Ramón Sotomayor-Zárate

2 0 1 7

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento obtenido por el **Proyecto FONDECYT Regular N° 116-0398** del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. Los resultados de esta tesis han sido presentados en el XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Chiloé, Chile.

Agradecer en primer lugar a mi director de tesis, Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, por apoyarme y guiarme durante todo el proceso que no fue fácil, agradezco profundamente todo su apoyo y compromiso, sin duda uno de los mejores docentes que he tenido la oportunidad de conocer.

A mis compañeros de laboratorio, a los presentes y los que estuvieron, por hacer la estadía en el lab agradable, es un gusto trabajar en un ambiente tan grato. Sin ustedes los experimentos hubiesen sido mucho más complejos. A Jonathan Martínez, por su gran ayuda a finalizar los experimentos y por resolver dudas. En definitiva, a todos quienes han hecho posible este trabajo.

Siempre será un gusto compartir una cerveza con todos ustedes. De corazón, muchas gracias.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis va dedicado a mi madre, Adriana Valverde y a mi abuela
Adriana Miranda. Este logro es para ustedes.

Gracias infinitas.

INDICE

INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS.....	6
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	9
ABREVIACIONES	11
1) INTRODUCCIÓN.....	12
1.1) Efecto de las Hormonas Sexuales en Áreas Dopaminérgicas y Serotoninérgicas. .	12
1.1.1) Hormonas Sexuales.....	12
1.1.2) Efectos de Hormonas Sexuales en Áreas Dopaminérgicas.	14
1.1.3) Sistema Serotoninérgico.....	15
1.1.4) Biosíntesis y Metabolismo de 5-HT.....	17
1.1.5) Rol de la 5-HT en el SNC.....	17
1.2) Septum Lateral	18
1.2.1) Neuroanatomía Funcional del SL.....	18
1.2.2) SL y Hormonas Sexuales.	21
1.3) Concepto de “Reprogramación”.....	22
2) HIPÓTESIS	24
3) OBJETIVOS	25
3.1) Objetivo General.....	25
3.2) Objetivos Específicos.....	25
4) MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1) Reactivos.....	26
4.2) Animales.....	26
4.3) Administración de EV, TP, DHT y Aceite de Sésamo:	26
4.4) Microdisección y Homogenización del SL.....	27
4.4.1) Determinación del Contenido de Neurotransmisores y Metabolitos en SL. .	28
4.5) Determinación de los Niveles de Expresión de TH en SL.....	29
4.6) Registro del Ciclo Estral.....	30
4.7) Análisis Estadístico.....	32
5) RESULTADOS.....	33
5.1) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Curvas de peso y parámetros de función reproductiva.....	33
5.2) Modelo de Androgenización y Estrogenización Neonatal: Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas hembras adultas.....	34

5.3)	Modelo de Androgenización y Estrogenización neonatal: Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas machos adultos.....	35
5.4)	Efectos de la Exposición Neonatal a Hormonas Sexuales sobre la Ciclidad Estral..	36
5.5)	Resultados Neuroquímicos.....	37
5.5.1)	Contenido de DA y DOPAC al PND60 en SL de ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT.	37
5.5.2)	Contenido de 5-HT y 5-HIAA al PND60 en SL de ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT.	39
5.5.3)	Contenido de NA al PND60 en SL de ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT.	41
5.5.4)	Razón de Recaptación ([Metabolito]/[Neurotransmisor]) en SL de ratas adultas con exposición neonatal a EV, TP y DHT.	42
5.6)	Resultados Celulares.	43
5.6.1)	Expresión de TH en SL de ratas adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales. Experimentos de Western Blot.	43
6)	DISCUSIÓN	45
6.1)	Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre el contenido de DA en SL.	45
6.2)	Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre el contenido de 5-HT en SL.....	48
6.3)	Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre el contenido de NA en SL.....	49
7)	CONCLUSIONES.....	50
8)	BIBLIOGRAFÍA:	51

INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

FIGURAS:

Figura 1:	Circuitos dopaminérgicos en cerebro de rata	15
Figura 2:	Imagen de neurona serotoninérgica	17
Figura 3:	Síntesis y degradación de la 5-HT	19
Figura 4:	Ubicación neuroanatómica del SL de rata y humano	20
Figura 5:	Esquema de la conectividad del SL con áreas cerebrales extra-septales ..	22
Figura 6:	Rebanada de cerebro de 2mm de espesor para microdisectar el SL	29
Figura 7:	Fotografía del frotis vaginal de la rata	32

GRÁFICOS:

Gráfico 1:	Curva de peso de ratas machos y hembras	33
Gráfico 2:	Peso de tejidos sensibles a hormonas sexuales: Ovario	34
Gráfico 3:	Peso de tejidos sensibles a hormonas sexuales: Testículo	35
Gráfico 4:	Ciclos estrales de la rata	38
Gráfico 5:	Contenido de DA y DOPAC en SL de ratas adultas machos y hembras ...	40
Gráfico 6:	Contenido de 5-HT y 5-HIAA en SL de ratas adultas machos y hembras ...	42
Gráfico 7:	Contenido de NA en SL de ratas adultas machos y hembras	43
Gráfico 8:	Cuantificación de TH en SL de ratas machos adultas	44
Gráfico 9:	Cuantificación de TH en SL de ratas hembras adultas	45

TABLAS:

Tabla 1:	Razón metabolito/neurotransmisor	43
----------	--	----

RESUMEN

Las hormonas sexuales pueden modular áreas del cerebro involucradas en funciones de memoria, locomoción, toma de decisiones y conductas motivadas, tanto durante etapas tempranas del desarrollo como en la adultez. Dentro de estas áreas cerebrales sensibles a la acción de hormonas sexuales, el área septal ha sido menos estudiada y ha sido asociada a la regulación de la homeostasis y de ciertas conductas. Al respecto, en esta tesis se estudiaron los efectos neuroquímicos de la administración neonatal de hormonas sexuales sobre el contenido de dopamina (DA), serotonina (5-HT) y noradrenalina (NA) en el área septal parte lateral (SL) de ratas hembras y machos adultas. Además, se cuantificó el nivel de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en SL de animales adultos tratados durante las primeras horas de vida postnatal con hormonas sexuales y aceite de sésamo como vehículo.

Los resultados obtenidos demuestran que la administración neonatal de dihidrotestosterona produce un aumento significativo de DA en SL en ratas machos y hembras adultas. Por otro lado, la administración de estradiol y testosterona produjo una disminución significativa de 5-HT en SL en ratas hembras, mientras que en machos adultos la administración neonatal de andrógenos aumentó significativamente los niveles de 5-HT en SL. Respecto a NA se observó una disminución en SL de ratas hembras adultas tratadas neonatalmente con testosterona, mientras que en machos la administración de esta hormona la aumentó. Los niveles de expresión de TH en SL de ratas machos adultas tratadas con hormonas sexuales durante las primeras horas de vida postnatal no cambiaron

significativamente, mientras que en ratas hembras adultas la administración neonatal de EV aumentó significativamente los niveles de expresión de TH.

En conclusión, estos resultados demuestran que el SL es un área cerebral sensible a la acción de hormonas sexuales y que la exposición temprana a estas hormonas afecta el contenido de neurotransmisores monoaminérgicos en SL de animales adultos. Posiblemente estos cambios se relacionan con un aumento o disminución de la síntesis o metabolización de estos neurotransmisores, lo que podría afectar funciones fisiológicas reguladas por el SL. Sin embargo, estudios posteriores deberán ser direccionados para evaluar estos efectos deletéreos.

ABSTRACT

Sex hormones can modulate areas of the brain involved in memory, locomotion, decision making, and motivated behaviors, both during early stages of development and in adulthood. Within these brain areas sensitive to the action of sex hormones, the septal area has been less studied and has been associated with the regulation of homeostasis and certain behaviors. In this respect, in this thesis were studied the neurochemical effects of neonatal administration of sex hormones on the content of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) in the lateral septal area (SL) of female and adult male rats. In addition, it was quantified the level of expression of the enzyme tyroxine hidroxilase (TH) in SL of adult animals treated during the first hours of postnatal life with sex hormones and sesame oil as vehicle.

The results obtained demonstrate that the neonatal administration of dihydrotestosterone results in a significant increase of DA in SL in adult male and female rats. On the other hand, administration of estradiol and testosterone produced a significant decrease of 5-HT in SL in female rats, while in adult males neonatal administration of androgens significantly increased 5-HT levels in SL.

Regarding NA, there was a decrease in SL of adult female rats treated neonatally with testosterone, whereas in males the administration of this hormone was increased. The levels of TH expression in SL of adult male rats treated with sex hormones during the first hours of postnatal life did not change significantly, whereas in adult female rats the neonatal administration of EV significantly increased levels of TH expression.

In conclusion, these results demonstrate that SL is a sensitive brain area to the action of sex hormones and that the early exposure to these hormones affects the content of monoaminergic neurotransmitters in SL of adult animals. Possibly these changes are related to an increase or decrease in the synthesis or metabolization of these neurotransmitters, which could affect physiological functions regulated by SL. However, further studies should be directed to evaluate these deleterious effects.

ABREVIACIONES

Abreviatura	Nombre
TP	Testosterona Propionato
EV	Estradiol Valerato
TH	Tirosina Hidroxilasa
VTA	Área Tegmental Ventral
SL	Septum Lateral
SM	Septum Medial
SP	Septum Posterior
NAcc	Núcleo Accumbens
SLD	Septum Lateral Dorsal
SLI	Septum Lateral Intermedio
SLM	Septum Lateral Medio
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
NA	Noradrenalina
CE	Cuerpo Estriado
CPF	Corteza Prefrontal
DA	Dopamina
SN	Sustancia Nigra
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCA	Ácido Perclórico
HPLC-EC	Cromatografía Líquida de Alta Precisión acoplada a un Detector Electroquímico
WB	Western Blot
5-HT	Serotonina
5-HIAA	Ácido 5- Hidroxi-indolacético

1) INTRODUCCIÓN

En esta tesis se estudió una estructura del sistema límbico, conocida como la parte lateral del área septal o septum lateral (SL) que ha sido involucrada en el control de conductas emocionales, función autonómica y homeostasis. En este sentido, los efectos sobre la neuroquímica monoaminérgica del SL y la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en ratas adultas de ambos sexos expuestas a hormonas sexuales durante las primeras horas de vida fueron estudiadas en esta tesis. A continuación se revisarán los conceptos más importantes para el entendimiento global de la racional científica que llevó al desarrollo de esta tesis.

1.1) Efecto de las Hormonas Sexuales en Áreas Dopaminérgicas y Serotoninérgicas.

1.1.1) Hormonas Sexuales.

Las hormonas sexuales presentan características fisicoquímicas que las hacen ser muy lipofílicas, por este motivo son capaces de cruzar membranas biológicas y ejercer sus efectos a través de receptores citoplasmáticos. Éstas y otras características permiten que las hormonas sexuales (como estrógenos y andrógenos) puedan cruzar la barrera hematoencefálica y tener efectos a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), por ejemplo favoreciendo la conectividad neural [1,2]. La principal hormona sexual masculina en el macho es la testosterona (T) y se sintetiza mayoritariamente en las células de Leydig del testículo [3], mientras que en la hembra la T es sintetizada en las células de la teca del ovario, siendo el principal precursor para la síntesis del 17- β -Estradiol (E_2) [4,5]. La T induce la expresión de genes blancos por la activación directa del receptor de andrógenos (AR) o por la interacción indirecta con receptores de estrógenos (ERs) debido a su

aromatización a E₂. En machos, la T circulante es aromatizada a E₂ a través de la acción de la enzima aromatasa citocromo P450 (Cyp19A1), expresada en tejidos periféricos y en cerebro [6]. Por otro lado, la T puede convertirse, por acción de la enzima 5α-reductasa, en Dihidrotestosterona (DHT), el cual es un andrógeno no-aromatizable y con mayor potencia que la T sobre el AR [7]. A nivel cerebral, los efectos de la T sobre el encéfalo de roedores han sido asociados a efectos estrogénicos indirectos, que se producen durante en ciertas ventanas específicas del desarrollo y que dependerían de los patrones de expresión de la aromatasa [para revisión ver 6,8].

En las hembras, el principal y más potente estrógeno es el E₂, mientras que la estrona y estriol poseen una menor afinidad por ERs. Los ERs citoplasmáticos son parte de la superfamilia de receptores nucleares para esteroides, y se clasifican en ER alfa y ER beta o ESR1 y ESR2, respectivamente [9]. Estos receptores son responsables de los principales efectos mediados por estrógenos en tejidos reproductivos y no reproductivos, como el cerebro. Los ESR1 y ESR2, así como el AR se encuentran presentes en el cerebro de mamíferos modulando la actividad neuronal [10], y para el caso de esta tesis, específicamente a neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y mesocorticolímbicas [11-13] (ver figura 1). Cabe señalar, que en varias áreas cerebrales (como el cuerpo estriado) se ha observado un receptor para estrógenos de membrana del tipo metabotrópico acoplado a proteína G (Gi/o o Gs, dependiendo del el área cerebral y etapa del desarrollo) que rápidamente afectaría la transmisión sináptica y ha sido denominado con el acrónimo GPER [14,15].

Figura 1: Circuitos Dopaminérgicos en Cerebro de Rata

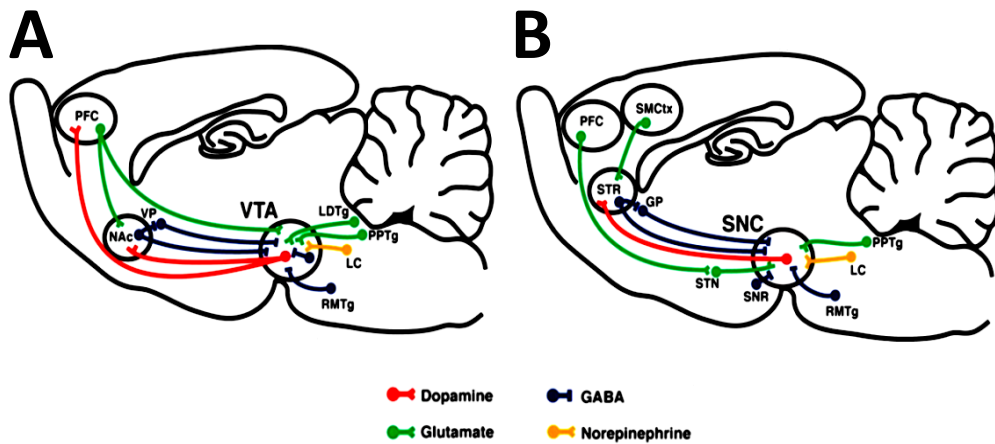


Figura 1: Vías dopaminérgicas Mesocorticolímbico (A) y Nigroestriatal (B). Figura tomada y adaptada de referencia [16].
Abreviaturas: PFC, corteza prefrontal; NAc, Núcleo Accumbens; VP, pálido ventral; VTA, área tegmental ventral; LDTg, tegmento laterodorsal; PPTg, núcleo pedunculopontino tegmental; LC, locus coeruleus; RMTg, núcleo rostromedial tegmental; SMCtx, corteza somatosensorial; STR, estriado; GP, globo pálido; STN, núcleo subtalámico; SNC, sustancia nigra compacta; SNR, sustancia nigra reticular.

1.1.2) Efectos de Hormonas Sexuales en Áreas Dopaminérgicas.

Estudios en animales han demostrado que proteínas involucradas en la regulación del sistema dopaminérgico son moduladas por las hormonas sexuales [17-19]. En este sentido, se ha demostrado por ejemplo que las hormonas sexuales pueden afectar la tirosina hidroxilasa (TH), una enzima clave para la síntesis de dopamina (DA) [20-22]. Otra proteína sensible a la acción de las hormonas sexuales es el transportador de dopamina (DAT). En este sentido, la ovariectomización reduce los niveles de expresión de DAT en Núcleo Accumbens (NAcc) y el reemplazo con E₂ restaura los niveles de expresión normal de DAT [23]. Además, la afinidad de DAT en estriado de ratas adultas OVX se encuentra disminuida y el reemplazo con E₂ y tamoxifeno (un modulador selectivo de ERS) incrementan la afinidad de DAT en cuerpo estriado (CE) [24-26].

Respecto a otras proteínas involucradas en la transmisión dopaminérgica, como los receptores, se ha observado que los niveles del receptor de DA tipo 2 (D₂) están

significativamente aumentados en NAcc y CE de ratas OVX, mientras que el reemplazo hormonal con E₂ reduce los niveles de D₂ a niveles semejantes al de ratas controles [23]. Estudios de hibridación *in situ* han demostrado que luego de 14 días de tratamiento con E₂ se reduce la expresión de mRNA de D₂ en CE y NAcc, sin afectar la expresión de los receptores tipo 1 (D₁) y tipo 3 (D₃) en las mismas áreas cerebrales [27]. Por otro lado, se ha observado que en ratas OVX tratadas con E₂ se incrementa la expresión del mRNA de D₁, D₂ y D₃ en corteza prefrontal y del mRNA de DAT en VTA [28-30]. Por otra parte, no solo neuronas dopaminérgicas han sido estudiadas en su relación con hormonas sexuales, sino también células endoteliales, algunas células gliales y neuronas de otras áreas cerebrales, como neuronas hipocampales. Estas últimas, ha sido consideradas como “células diana” para la acción de los estrógenos, ya que han sido involucradas en procesos de sinaptogénesis y otras formas de plasticidad neuronal [31]. Por ejemplo, el tratamiento con estrógenos en ratas adultas OVX aumenta la densidad de espinas dendríticas y la formación de nuevas sinapsis en neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo [32]. Funcionalmente estudios electrofisiológicos han demostrado que al aplicar un antagonista de los receptores de N-metil-D-aspartico (NMDA) se bloquea la sinaptogénesis inducida por estrógenos sobre las espinas dendríticas hipocampales de ratas OVX [32]. Esta evidencia ha demostrado que la activación de los receptores de NMDA es un factor esencial para el desarrollo de nuevas sinapsis inducidas por estrógenos.

1.1.3) Sistema Serotoninérgico.

La serotonina (5-HT) es un importante neuromodulador que está asociada a una gran variedad de procesos fisiológicos en el SNC. Es producida desde los Núcleos del

Rafé (NR) ubicados en la formación reticular, demostrándose su importancia fisiológica en la conectividad cerebral, desarrollo celular, la migración y la citoarquitectura neuronal, entre otras [33]. Estudios muestran que la 5-HT es capaz de autoregular la morfología de la ramificación de las neuronas serotoninérgicas y alteraciones en su síntesis o metabolización puede afectarlas [34]. Por otro lado, los niveles normales de concentración tisular de 5-HT pueden ser alterados por varios factores deletéreos como alteraciones en la nutrición [35], exposición al estrés y exposición a hormonas sexuales [36]. En este sentido, nuestro laboratorio ha demostrado que la administración neonatal de hormonas sexuales aumenta el contenido de 5-HT en SN y VTA de ratas hembras adultas [19].

Figura 2: Neurona Serotoninérgica.

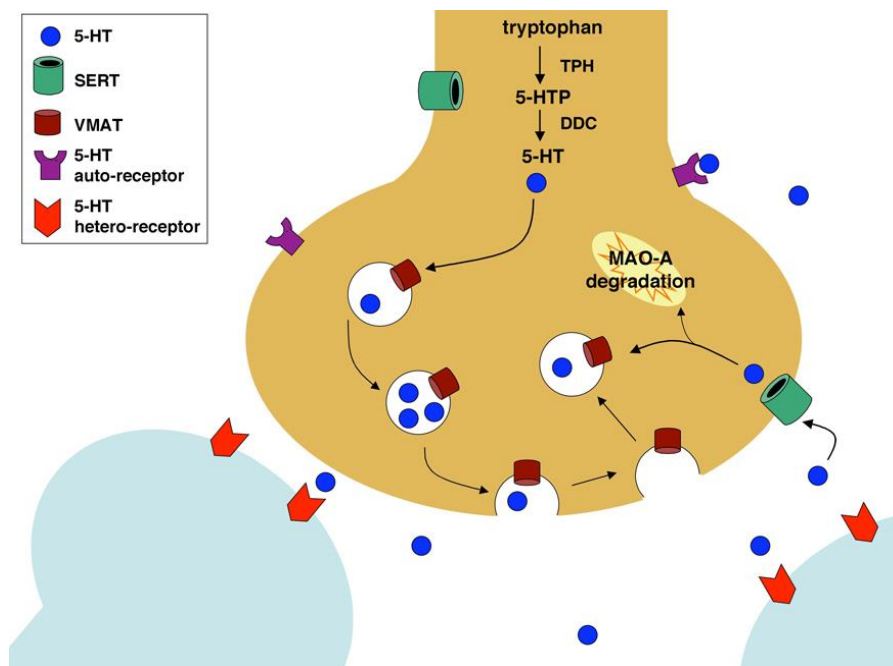


Figura 2: Esquema ilustrativo de la síntesis y liberación de 5-HT. La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido triptófano obtenido principalmente de la dieta y en las neuronas serotoninérgicas la enzima triptófano hidroxilasa produce 5-hidroxitriptófano (5-HTP). El 5-HTP es convertido por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos a 5-HT, la cual es almacenada en vesículas para su posterior liberación [32].

La 5-HT es una amina biogénica que cumple roles fisiológicos como neurotransmisor, neuromodulador, hormona y regulador de la hemostasia, entre otros [37]. En la periferia cerca de un 95% de la 5-HT se encuentra en el sistema enterocromafin del tracto gastrointestinal y el resto en las plaquetas. Mientras que a nivel nervioso la 5-HT se ubica en neuronas triptaminérgicas del NR y en Sistema Nervioso Entérico [38]. En SNC las neuronas serotoninérgicas están concentradas en la línea media de la protuberancia y el bulbo raquídeo, específicamente en los NR y en menor medida en el *locus coeruleus* [20].

1.1.4) Biosíntesis y Metabolismo de 5-HT.

La síntesis de 5-HT se inicia a partir del aminoácido esencial triptófano (figura 3) que es oxidado en la posición 5 del anillo pirrólico, mediante la enzima triptófano-5-hidroxilasa (TpH-1). El 5-hidroxitriptófano producido es descarboxilado en la cadena lateral por la triptófano-5-descarboxilasa para producir 5-HT. Esta última enzima ha mostrado ser el factor limitante de la síntesis de 5-HT [32].

En cuanto al metabolismo de la 5-HT se han observado dos vías catabólicas, siendo la principal la desaminación oxidativa por la enzima monoaminoxidasa (MAO) para producir su principal metabolito inactivo, el ácido 5-hidroxi-indolacetaldehído, el cual es oxidado por la enzima aldehído deshidrogenasa que genera el producto metabólico final ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) [32].

1.1.5) Rol de la 5-HT en el SNC.

En el SNC la 5-HT ha sido implicada en varias funciones neurofisiológicas, incluyendo sueño, aprendizaje, memoria, ritmos biológicos, ansiedad y temperatura, entre otros. La 5-HT presente en el cerebro tiene principalmente un rol inhibitorio asociado a una hiperpolarización celular de la membrana causada por un aumento

en la conductancia del potasio [39]. A nivel patológico, alteraciones en el sistema serotoninérgico está involucrado en trastornos neuropsiquiátricos como desórdenes afectivos, conductas obsesivo-compulsivas, ansiedad y depresión, entre otras [32].

Figura 3: Síntesis y degradación de la 5-HT.

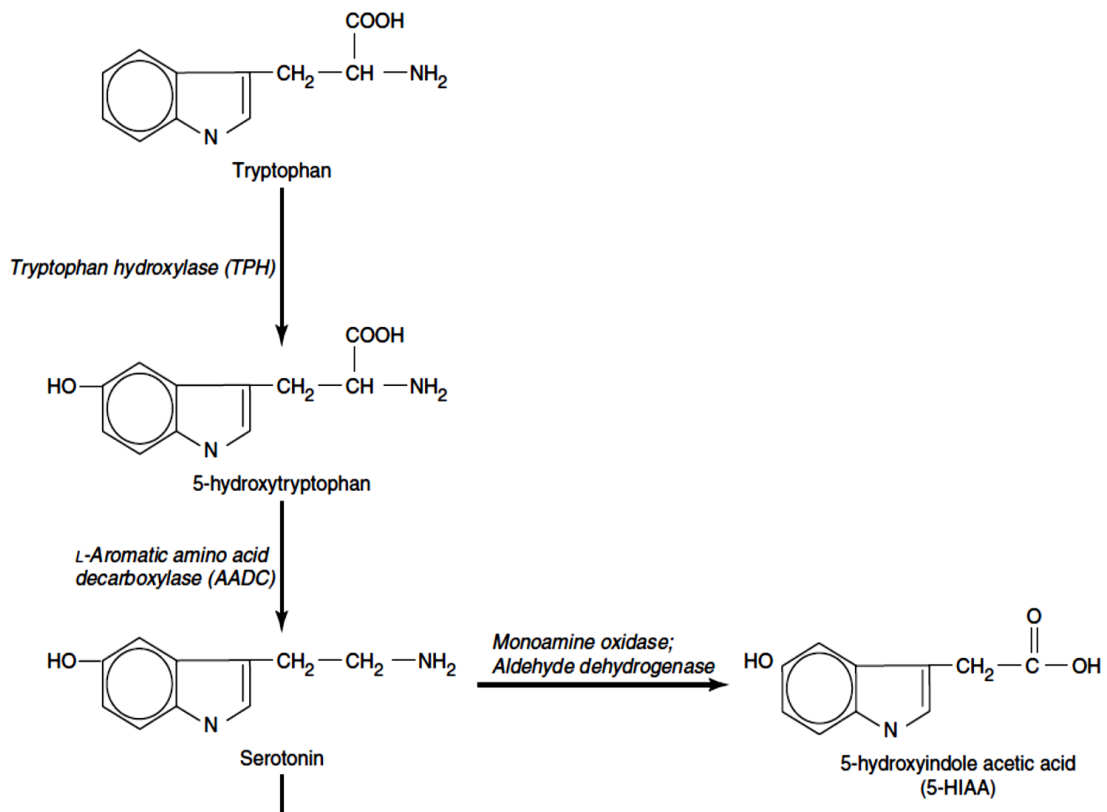


Figura 3: Esquema ilustrativo de las reacciones biosíntesis y metabolismo de la 5-HT.

1.2) Septum Lateral

1.2.1) Neuroanatomía Funcional del SL.

El Área Septal, es una estructura del SNC que forma parte del sistema límbico y se encuentra dividida en la parte medial (SM), lateral (SL) y posterior (SP), basada en su topografía, citoarquitectura y conexiones de este núcleo [40]. Anatómicamente, el SL se encuentra ubicado en el prosencéfalo (área subcortical) ligeramente en

posición dorsocaudal al NAcc, rostradorsal al hipotálamo y a la decusación de la comisura anterior [41] (ver figura 4). El SL es considerado una estación de relevo de información nerviosa que conecta a estructuras mesencefálicas y diencefálicas (VTA e hipotálamo), con otras estructuras límbicas como el hipocampo y telencefálicas como la corteza pre-frontal (CPF) [42]. A nivel fisiológico, el SL participa activamente en el control de variados procesos como la regulación de las emociones, respuestas al estrés, la agresión, la regulación de respuestas autonómicas, humorales y funciones cognitivas superiores [40].

Figura 4: Ubicación neuroanatómica del SL en rata (A) y humano (B).

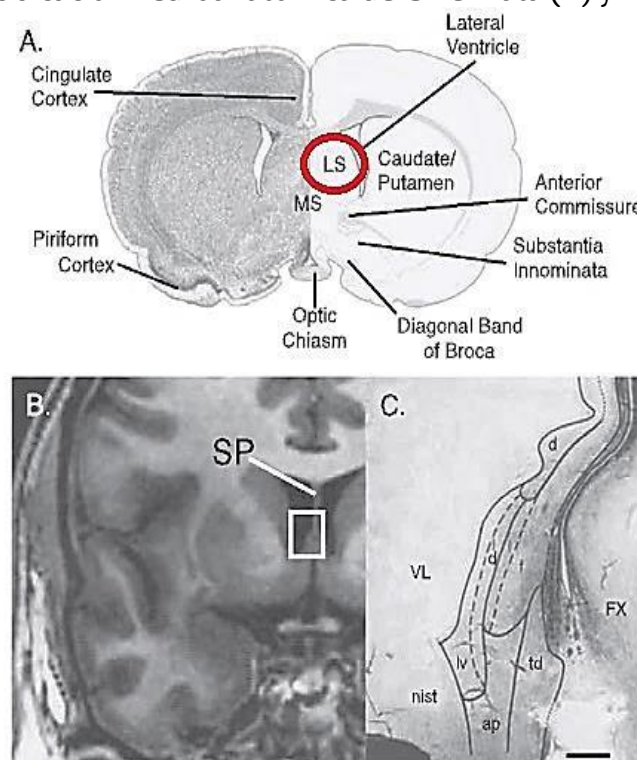


Figura 4: Ubicación del septum lateral (SL) en el cerebro de ratas (a) y humanos (b). En humanos el área septal se denomina Septum pellucidum (SP). Figura tomada de [40].

A nivel de conectividad, el SL tiene una compleja organización topográfica que involucra sistemas monoaminérgicos, colinérgicos, aferencias y eferencias aminoacídicas provenientes de áreas extra septales y desde el SM (ver figura 5). Así

por ejemplo, el SL recibe proyecciones dopaminérgicas desde el VTA, las cuales hacen sinapsis directas con las dendritas septales [43,44]. Por otro lado, también recibe proyecciones serotoninérgicas desde el NR Dorsal (NRD) [45].

El SL posee conexiones bidireccionales de origen telencefálicas, diencefálicas y del tronco del encefalo. El SL recibe importantes aferencias hipocampales y envía eferencias principalmente hacia hipotálamo [40]. Sin embargo, proyecta y recibe información de áreas mesencefálicas como la SN, el VTA y el NRD (ver figura 5) [40,44,45].

Las neuronas del SL fundamentalmente son del tipo GABAérgico y presentan una heterogeneidad morfológica interesante que ha sido estudiada por microscopía de luz y electrónica, lo que ha llevado a clasificarlas en tres diferentes grupos neuronales: Neuronas Tipo I: Estas neuronas se encuentran ubicadas en el septum lateral dorsal (SLD) y presentan un cuerpo celular grande, con un diámetro entre 15 a 20 μm . Las ramas dendríticas distales presentan espinas cortas, mientras el soma y las dendritas primarias no las tienen. Este tipo celular normalmente presenta varios axones colaterales las cuales forman elaboradas arborizaciones [43]. Neuronas Tipo II: Estas neuronas comprenden un grupo más diverso, generalmente localizadas en el Septum Lateral Intermedio (SLI). Debido a sus diferencias morfológicas, se dividen en neuronas tipo IIa y IIb. Las neuronas tipo IIa se encuentran más hacia medial del SLI y sus dendritas pueden ramificarse hacia el septum lateral medial (SLM) y SM, formando conexiones entre ambos núcleos. El cuerpo celular de estas neuronas son de tamaño medio, bipolares, de los cuales emergen grandes dendritas, con pocas espinas [43]. Las neuronas IIb, más conocidas como somatoespinosas [43], representan aproximadamente el 25% de las neuronas

totales del SL. Estas neuronas tienen un cuerpo celular mediano de forma ovoide o triangular, con un número mayor a 5 dendritas por célula. Las neuronas somatoespinosas proyectan hacia afuera del área septal [46,47]. Neuronas Tipo III: Este tipo de neurona se encuentra exclusivamente en el Septum Lateral Ventral. Son neuronas con un soma pequeño, redondo u ovoide con pequeños campos dendríticos. Las dendritas son cortas pero tienen gran número de espinas [46,47].

Figura 5: Esquema de conectividad del SL con áreas cerebrales extra-septales.

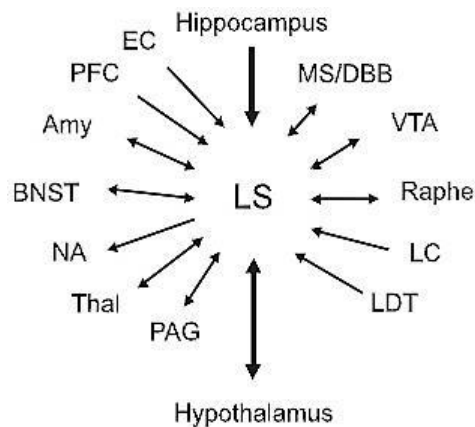


Figura 5: Resumen con las principales aferencias y eferencias del SL tomado de [40]. EC: corteza entorrinal, PFC: corteza prefrontal, Amy: Amígdala, BNST: Lecho de la Estría Terminal, NA: Núcleo Accumbens, Thal: Talamo, PAG: Gris periacueductal, LDT: Tegmento laterodorsal, LC: locus ceruleus, VTA: Área tegmental ventral, MS: Septum medial y DBB: Banda diagonal de Broca.

1.2.2) SL y Hormonas Sexuales.

Las neuronas del SL son neuromoduladas por hormonas sexuales ya que expresan AR y ERs, específicamente el ARNm para el AR se expresa ampliamente en las neuronas del SL, mientras que el ARNm para ESR1 y ESR2 se expresan mayoritariamente en neuronas del SLD y SLI [46,47]. Por otro lado, el SL es una de las áreas cerebrales que más expresa AR [48] y estaría entre otras modulando conductas de saciedad sexual [49].

1.3) Concepto de “Reprogramación”.

El concepto de reprogramación ha sido definido como la redirección fisiológica de un tejido u órgano por efecto de un estímulo o daño en un período sensible del desarrollo fetal o neonatal (postnatal temprano), el cual provoca cambios funcionales a largo plazo [50]. Lo importante de esta definición es que, durante el desarrollo, existen períodos críticos de vulnerabilidad, que son ventanas de sensibilidad, para condiciones adversas que pueden redireccionar la fisiología normal de diferentes órganos en el organismo.

Se ha observado, que a nivel de sistema reproductivo, la exposición neonatal a compuestos con actividad estrogénica produce alteraciones en el funcionamiento de las gónadas, afectando la fertilidad en humanos y animales [51]. En la década de los 60 se demostró que la exposición neonatal a testosterona (T) en el día postnatal (PND) 5 produjo, en ratas hembra adultas, una condición anovulatoria acompañada de la formación de quistes ováricos [52]. En Chile, el grupo del Dr. Hernán E. Lara demostró en el año 2011 que la administración neonatal de una dosis única de hormonas sexuales, como estradiol valerato (EV) o testosterona propionato (TP), produce en ratas hembras adultas alteraciones reproductivas y neuroquímicas en el contenido de neurotransmisores en el hipotálamo ventromedial [53]. Recientemente, nuestro laboratorio ha demostrado que la administración neonatal de EV y de TP aumentan el contenido de catecolaminas en el circuito mesocorticolímbico a través de un aumento de la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en Sustancia Nigra (SN) y Área tegmental ventral (VTA) [22,54]. El aumento del contenido de DA en VTA de ratas machos adultas se asocia a una mayor liberación de DA inducida por estímulos depolarizantes en NAcc [22].

A nivel neuroquímico la androgenización neonatal con T en ratas hembras produce la disminución a largo plazo de los niveles extracelulares de 5-HT en la amígdala [55].

A nivel conductual, la exposición neonatal a T produce una disminución de la memoria espacial y de neuronas TH positivas en CPF, en un modelo animal de déficit atencional con hiperactividad [56]. Por otro lado, la exposición neonatal a Estradiol benzoato produce un aumento en el contenido de 5-HT en el NRD, sin producir cambios en el contenido del principal metabolito de la 5-HT, el ácido 5-Hidroxi indolacético (5-HIAA) [36].

En resumen, como se ha descrito anteriormente la reprogramación neonatal con hormonas sexuales produce cambios permanentes en neuronas monoaminérgicas de áreas mesencefálicas y en sus proyecciones hacia estructuras límbicas relacionadas con el procesamiento emocional, cognitivo, humoral y motivacional. Por otro lado, el SL expresa receptores para hormonas sexuales y los efectos neuroquímicos a largo plazo producidos por la reprogramación neonatal con estas hormonas no ha sido estudiado.

2) HIPÓTESIS

Basado en los antecedentes descritos que nos demuestran la neuromodulación de neuronas dopaminérgicas por hormonas sexuales y que la exposición temprana de estas hormonas produce efectos a largo plazo, hemos planteado la siguiente hipótesis: **“La administración neonatal de T, EV y dihidrotestosterona (DHT) en ratas de ambos sexos aumenta el contenido de aminas biogénicas en SL que se relacionaría a un aumento de la expresión septal de la TH”**.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo General.

Estudiar los efectos de la administración neonatal de TP, EV y DHT, sobre el contenido tisular de monoaminas y la expresión de la TH en SL de ratas adultas de ambos sexos.

3.2) Objetivos Específicos.

Para el desarrollo de este proyecto de tesis se planteó realizar los siguientes objetivos específicos.

- Estudiar los efectos de la administración al día postnatal (PND) 1 de TP (1,0 mg/50 µL aceite de sésamo), DHT (1,0 mg/50 µL aceite de sésamo), EV (0,1 mg/50 µL aceite de sésamo) o de aceite de sésamo (50 µL s.c.) en ratas hembras y machos sobre el contenido de NA, DA y 5-HT en SL al PND 60. Como medida de la recaptación se midió el contenido tisular de DOPAC y 5-HIAA, principales metabolitos de DA y 5-HT, respectivamente. Para cumplir con este objetivo específico se utilizó cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección electroquímica (HPLC-EC).
- Estudiar los efectos de la administración al PND 1 de TP (1,0 mg/50 µL aceite de sésamo), DHT (1,0 mg/50 µL aceite de sésamo), EV (0,1 mg/50 µL aceite de sésamo) o de aceite de sésamo (50 µL s.c.) en ratas hembras y machos sobre la expresión de TH en el SL al PND 60. Para cumplir con este objetivo específico se utilizó la técnica de inmunoblots.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) Reactivos.

El estándar de DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA, EDTA, EV, TP, DHT, aceite de sésamo y ácido 1-octanosulfónico fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Missouri, EE.UU). Todos los otros reactivos utilizados en esta tesis serán de grado analítico y molecular según corresponda.

4.2) Animales.

Se utilizaron 93 ratas Sprague-Dawley machos y hembras (PND 1) provenientes de camadas recién paridas del Bioterio de Animales de la Universidad de Valparaíso. Todos los animales fueron alojados en una sala de mantención del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso a una temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) y humedad ($50 \pm 5 \%$) controladas, bajo ciclos de luz-oscuridad (12:12 horas) encendiendo las luces a las 08:00 am. Todos los procedimientos experimentales planteados en este proyecto de tesis han sido aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso y otorgados al Proyecto FONDECYT Regular N° 116-0398 cuyo investigador responsable es el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate (Director de esta tesis). En esta tesis, se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

4.3) Administración de EV, TP, DHT y Aceite de Sésamo:

Diferentes camadas de ratas de ambos sexos fueron inyectadas con EV, TP, DHT y aceite de sésamo. Cada animal del grupo EV se inyectó durante las primeras 12 horas de vida postnatal con 0,1 mg de EV disuelto en 50 μL de aceite de sésamo,

mientras que las ratas de los grupos TP y DHT fueron inyectadas con una dosis de 1,0 mg disuelto en 50 μ L de aceite de sésamo. Las camadas asignadas al grupo control fueron inyectadas con 50 μ L de aceite de sésamo (vehículo de disolución de las hormonas sexuales). Todas las crías fueron mantenidas con lactancia materna hasta el PND 21, para luego ser destetadas y alojadas por sexo y tratamiento en jaulas de tamaño estándar (16 cm de alto, 26 cm de ancho y 47 cm de largo) de 4 a 5 animales por caja. Para las ratas hembras de los grupos control y EV, se realizó frotis vaginal desde el PND 40 hasta el PND 60 para corroborar la etapa del ciclo estral el día de los experimentos. Las ratas hembras de los grupos TP y DHT no pudieron ser cicladas debido a hipoplasia vaginal que imposibilita realizar el frotis vaginal.

4.4) Microdissección y Homogenización del SL.

Al día PND 60-62 los animales fueron eutanasiados con guillotina para animales menores (Modelo 51330, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Sus cerebros fueron rápidamente removidos y puestos en una matriz para cerebro de acero inoxidable (Modelo 68711, RWD Life Science, Shenzhen, P.R.China) sobre hielo para ser microdisectado y obtener la rebanada donde se localiza el SL (ver figura 6).

Figura 6: Rebanada de cerebro de 2 mm de espesor para microdisectar SL.

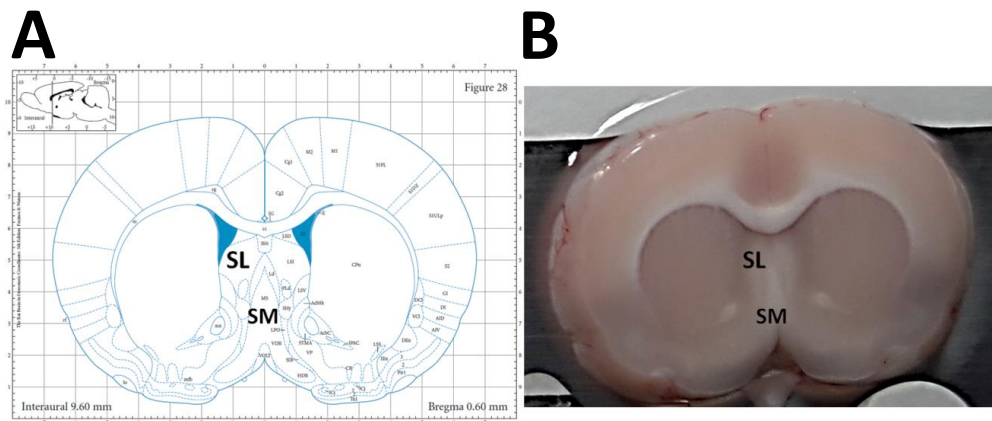


Figura 6: Panel A muestra un esquema coronal del Atlas de Cerebro de Rata de Paxinos & Watson [57]. Panel B rebanada coronal de 2 mm de espesor. SL: Septum Lateral, SM: Septum Medial.

Una vez microdisectado el SL se procedió a pesarlo en una balanza analítica (Modelo JK-180, Chyo, Japón) y a guardarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL a -80°C hasta su posterior uso. El SL se homogenizó según el protocolo publicado previamente por nuestro laboratorio [22,58]. Brevemente, a cada tubo con el respectivo SL se le agregaron 400 μL de ácido perclórico (PCA) 0,2 N y con la ayuda de un sonicador (Microson XL, Heat System) los tejidos fueron homogenizados. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4°C (Modelo Z233MK-2, Hermle Labor Technik GmbH, Wehingen, Alemania) y el sobrenadante obtenido se separó y filtró a través de una unidad de filtración de 0,2 μm de poro (modelo EW-32816-26, HPLC Syringe Filters PTFE, Cole-Parmer, Instrument Company, USA). La solución filtrada fue usada en la determinación de neurotransmisores monoaminérgicos y sus metabolitos en el HPLC-EC.

4.4.1) Determinación del Contenido de Neurotransmisores y Metabolitos en SL.

Diez μL de cada solución filtrada fueron inyectados en un HPLC-EC con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus,

Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna C18 (Modelo MF-8912, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un detector electroquímico (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0.5 nA. La fase móvil que se utilizó para la determinación de monoaminas fue bombeada a un flujo de 0,1 mL/min y tuvo la siguiente composición: 100 mM de NaH₂PO₄, 1.0 mM de ácido 1-octanosulfónico, 1.0 mM de EDTA y 3,5% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 2.3). Las áreas de los picos de monoaminas en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de NA, DA, DOPAC, 5-HT y 5-HIAA usando una curva de calibrado realizada en un programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón).

4.5) Determinación de los Niveles de Expresión de TH en SL.

Los SL se homogenizaron utilizando un buffer RIPA, que consta de 50 mM de Tris HCl (pH=8), 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 0,1% de SDS, 2 mM de EDTA pH 7,4 y 1,5 mM de PMSF, y con un cóctel inhibidor de proteasas (Cat# G6521, Promega™), para así extraer las proteínas a analizar, usando un sonicador (Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL, Heat Systems). La concentración de proteínas totales de cada muestra se determinó utilizando el equipo Epoch (BioTek™ Instruments Inc., EEUU). Las proteínas obtenidas se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en condiciones denaturantes (4% gel concentrador, 8% gel resolutivo), cargando 30 µg por cada pocillo. Se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro (Thermo™; Cat: 88018. Rockford, USA) durante 1,5 horas a 350 mA. Se bloquearon los sitios inespecíficos de las membranas incubándolas con leche descremada al 5% en T-TBS (Tween-20 al 0,1 % en solución de tris tamponada TBS –

20mM Tris, NaCl 137 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las membranas se incubaron con T-TBS durante toda la noche (O. N.) a 4°C, para así al día siguiente incubarlas con los anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: Anticuerpo primario anti-TH desarrollado en conejo (1:10000, Catalogo: N°657012, Calbiochem, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)) y anti-GAPDH desarrollado en conejo (1:10000; ab9485, Abcam). Luego de esto las membranas se lavaron 3 veces con T-TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (para TH) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Catalogo: N°BA-1000, Vector Laboratory Inc., Burlingame, CA, USA) y anti-conejo (para GAPDH) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) desarrollado en burro (1:10000, 711-036-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories) en T-TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario las membranas se incubaron con solución de revelado para quimioluminiscencia aumentada -ECL- (EZ-ECL; Biological Industries. Cat: 20-500-500) y se obtuvieron imágenes de la membrana revelada utilizando el equipo EpiChemi³ Darkroom, para posteriormente las imágenes ser analizadas utilizando el programa Image-J™ (NIH), cuantificando las bandas obtenidas en la membrana de nitrocelulosa, después de haber realizado el Western Blot.

4.6) Registro del Ciclo Estral.

El registro del ciclo estral fue a diario a partir del PND40 hasta la fecha de finalización de los experimentos. El ciclo estral fue caracterizado a través de los cambios citológicos que adopta el epitelio vaginal por defecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroideas y que caracterizan las etapas preovulatorias (ver figura 7) [59]. Proestro: Etapa del ciclo estral de la rata con

duración entre 12 y 24 horas y que citológicamente se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y solo algunas escamosas de forma irregular. Estro: Etapa del ciclo estral de la rata con duración entre 24 y 48 horas. Es el período de receptividad sexual por el macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma granular y agrupadas. Metaestro: Con duración entre 12 y 24 horas. Presencia en el frotis de leucocitos y células escamosas. Diestro: Etapa del ciclo estral con una duración aproximada de 48 horas y con alta presencia en el frotis de leucocitos.

Figura 7.

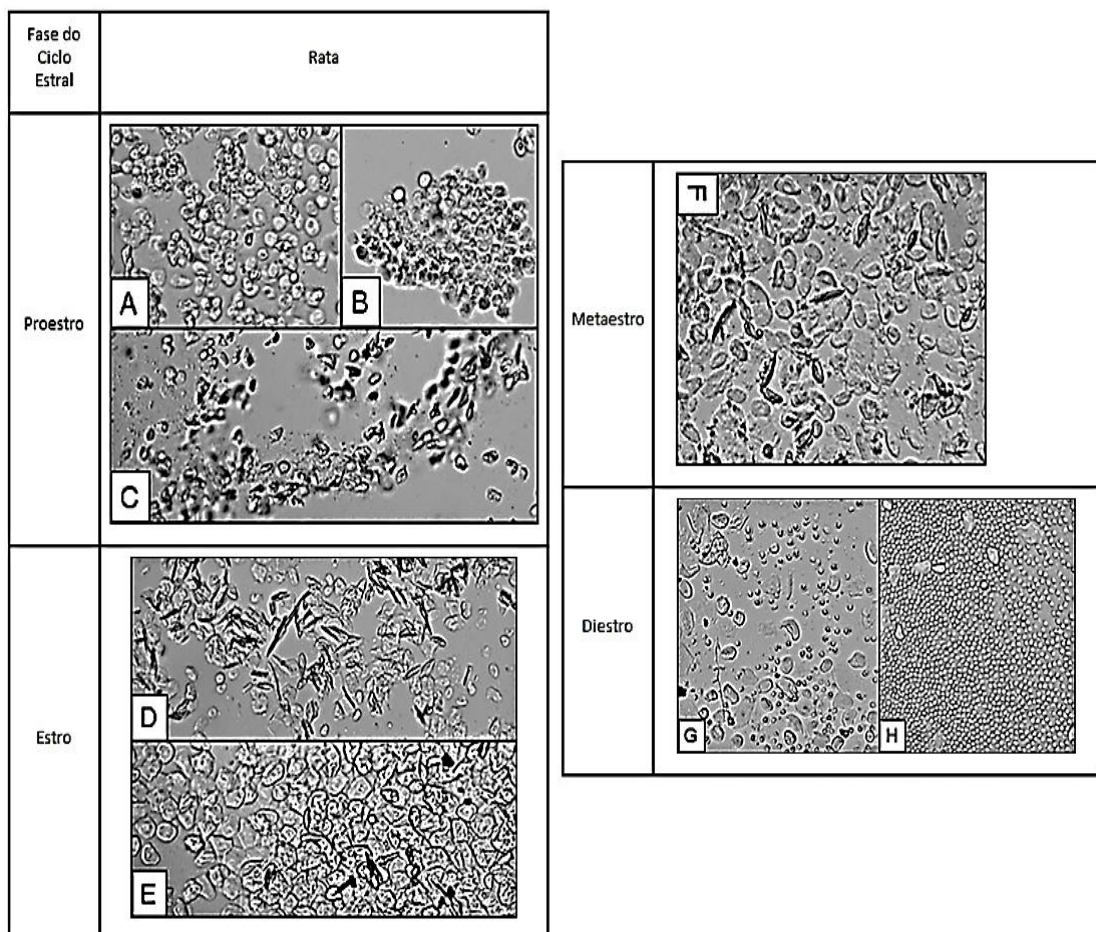


Figura 7: Fotografías tomadas del frotis vaginal de rata obtenidas en distintas fases del ciclo estral. A: Proestro, B: Estro, C: Metaestro, D: Diestro.

4.7) Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (SEM). Las diferencias entre los grupos control y tratamiento fueron analizadas mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguido de un post-hoc test Newman-Keuls. La diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p sea menor que 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5) RESULTADOS

5.1) Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Curvas de peso y parámetros de función reproductiva.

Dentro de los cambios observados producto de la administración de hormonas sexuales al PND1 se observó que no hubo cambios estadísticamente significativos en la curva de ganancia de peso al comparar animales control, tratados con EV, TP y DHT (ver gráfico 1, panel A y B).

GRÁFICO 1

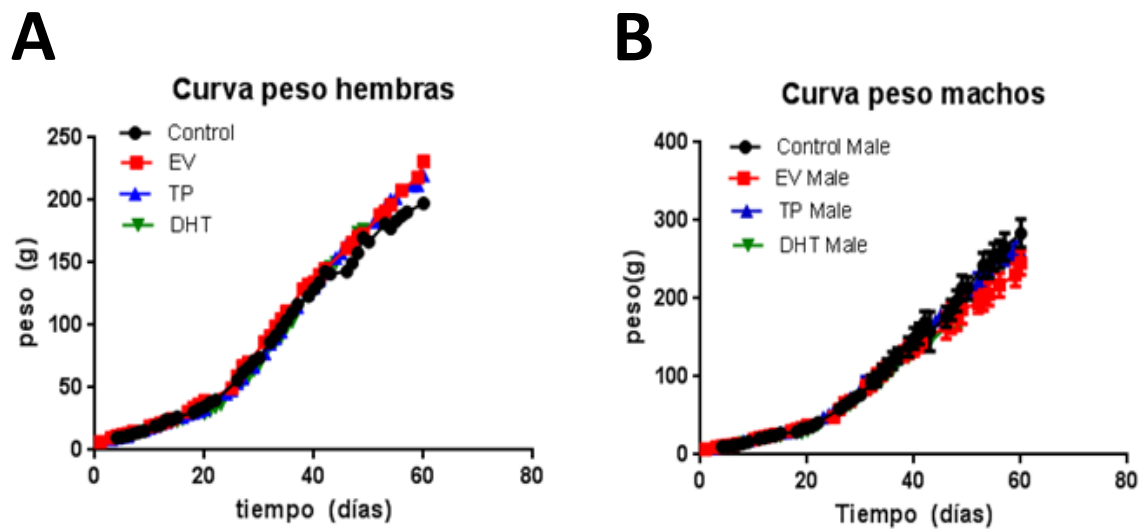


Gráfico 1: Curvas representativas de ganancia de peso de series experimentales control, tratadas con EV, TP y DHT al PND1. El panel A representa las curvas de peso para las ratas hembras y el panel B representa las curvas de ganancia de peso para las ratas machos. En (A) control n= 15 EV n= 14, TP n= 15, DHT n= 10. En (B) control n= 10, EV n= 10, TP n= 11, DHT n= 8.

5.2) Modelo de Androgenización y Estrogenización Neonatal: Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas hembras adultas.

Las hormonas sexuales tienen diversos tejidos blancos en el organismo, afectando diversos órganos reproductivos y no reproductivos. Por esta razón y según publicaciones previas se pesaron tejidos reproductivos sensibles a la acción de hormonas sexuales y que no dan cuenta de una reprogramación efectiva. Como podemos observar en hembras se observó una disminución significativa del peso del ovario izquierdo en ratas tratadas durante las primeras horas de vida con EV, TP y DHT, respecto al control (Ver gráfico 2).

GRÁFICO 2

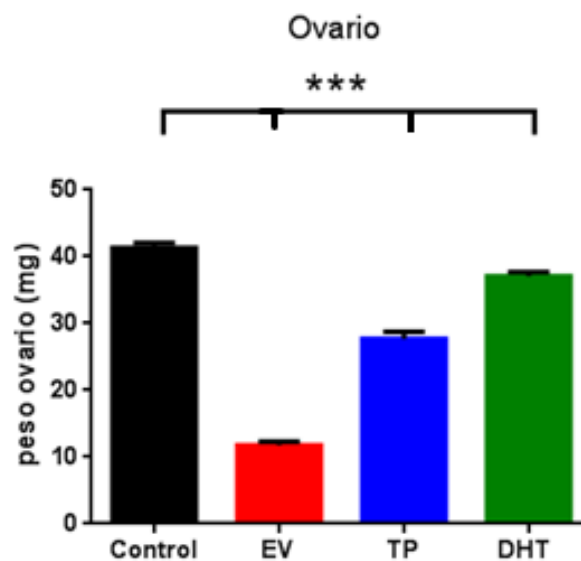


Gráfico 2: El gráfico muestra el tamaño del ovario al PND60 en ratas hembras control y tratadas durante las primeras horas de vida con hormonas sexuales (EV, TP y DHT). Los resultados son expresado como el promedio \pm EEM de animales control (n= 6), EV (n= 5), TP (n= 5), DHT (n=5). El análisis estadístico se realizó utilizando un One-Way ANOVA – Tukey multiple comparisons test. (***) $P < 0.001$.

5.3) Modelo de Androgenización y Estrogenización neonatal: Peso de tejidos sensibles a la acción de hormonas sexuales en ratas machos adultos.

En ratas machos inyectadas al PND1 con hormonas sexuales (EV, TP y DHT) se pudo observar una disminución estadísticamente significativa del peso del testículo izquierdo respecto a ratas control (ver gráfico 3). Nuevamente esta medición nos refleja que nuestro modelo de reprogramación neonatal es efectivo en producir cambios a largo plazo.

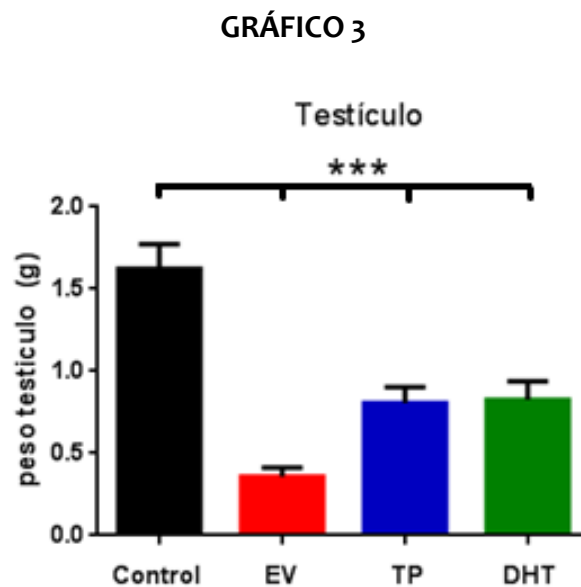


Gráfico 3: El gráfico 3 nos muestra el peso de los testículos en ratas control y tratadas con hormonas sexuales (EV, TP y DHT) al PND60. La administración de hormonas sexuales produce una disminución significativa del peso de la gónada masculina respecto a ratas control. Los resultados son expresado como el promedio \pm EEM de animales control (n= 6), EV (n= 6), TP (n= 5), DHT (n=5). El análisis estadístico se realizó utilizando un One-Way ANOVA – Tukey multiple comparisons test. (***) $P < 0.001$.

5.4) Efectos de la Exposición Neonatal a Hormonas Sexuales sobre la Ciclicidad Estral.

En ratas hembras la ciclicidad estral es una medida indirecta de la fertilidad y cada paso de proestro a estro indica una ovulación. Esta medida reproductiva también es una medida a evaluar de la efectividad de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales. En este caso como se ejemplifica en el gráfico 4 las ratas hembras control tienen una actividad cíclica normal (círculos negros), mientras que las ratas tratadas con EV (círculos azules) presentan aciclicidad. La ciclicidad estral no pudo ser realizada en hembras TP y DHT, debido a una agénesis vaginal externa que impide hacer los frotis.

GRÁFICO 4

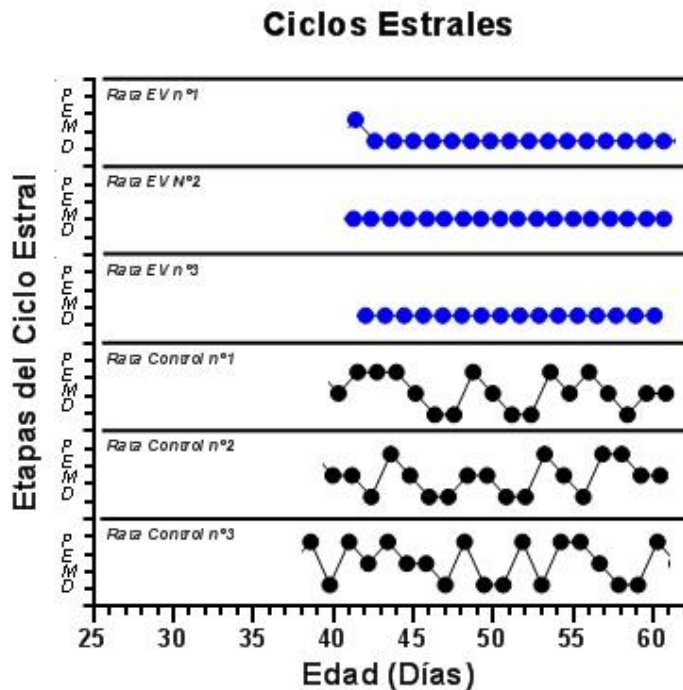


Gráfico 4: Ciclos estrales representativos de 3 hembras control (círculos negros) y 3 hembras EV (círculos azules) desde el PND40 al PND 60-62.

5.5) Resultados Neuroquímicos.

5.5.1) Contenido de DA y DOPAC al PND60 en SL de ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT.

Con respecto al contenido de DA en SL de ratas hembras no se observaron cambios estadísticamente significativos en las ratas tratadas con EV y TP, respecto al grupo de ratas hembras control. Sin embargo, en ratas hembras tratadas con DHT se observó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de DA (ver gráfico 5, panel A). En ratas machos el contenido de DA solo aumentó significativamente en ratas tratadas con DHT (gráfico 5, panel B).

Respecto al contenido de DOPAC, principal metabolito de DA en ratas, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ratas hembras tratadas con hormonas sexuales respecto a ratas hembras control (gráfico 5, panel C). Sin embargo, el contenido de DOPAC en SL de ratas machos adultos aumento significativamente en ratas tratadas con TP y DHT, respecto a ratas machos control (ver gráfico 5, panel D).

Gráfico 5

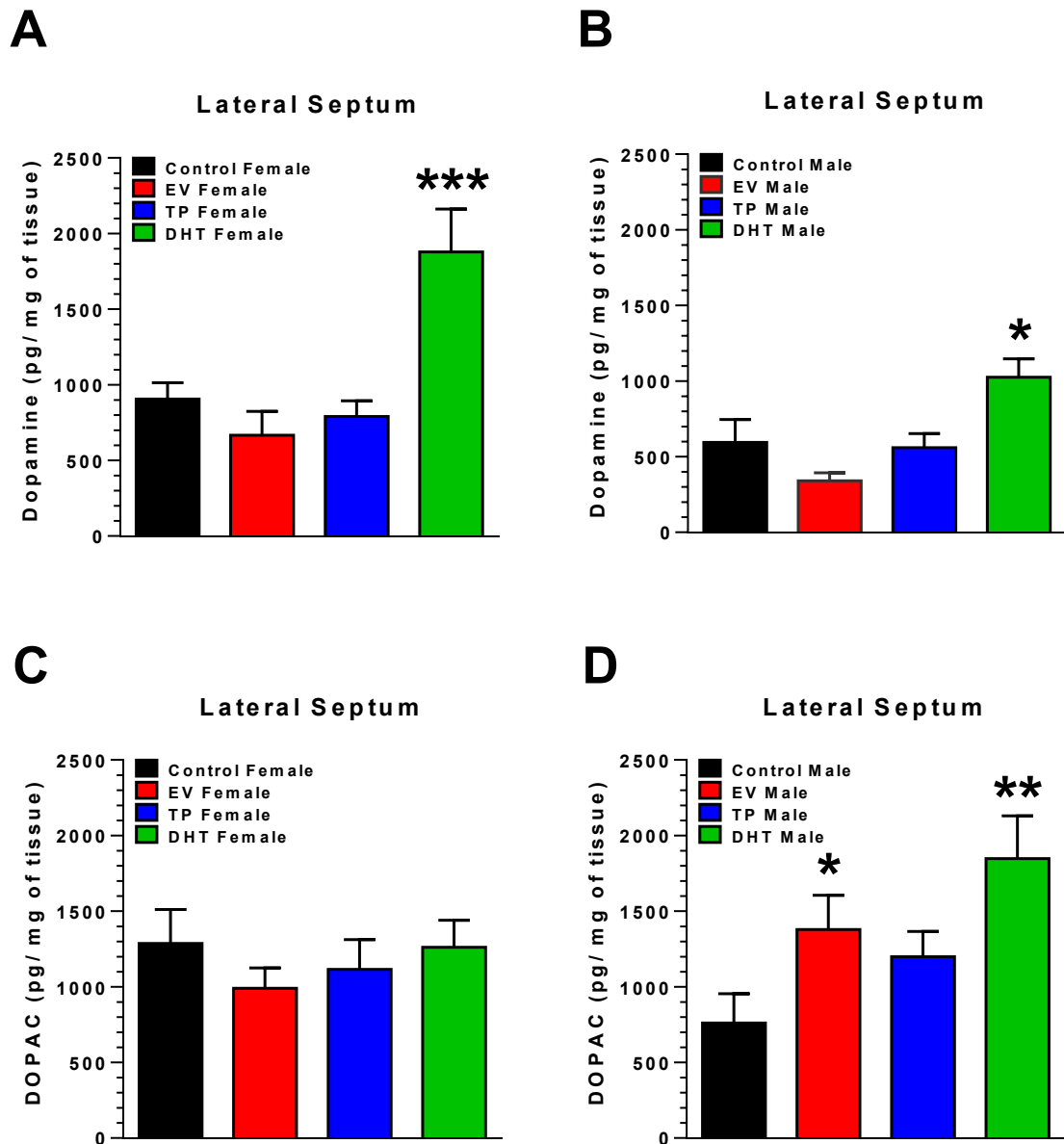


Gráfico 5: El gráfico 5 nos muestra el contenido de DA y DOPAC en SL de hembras (A y C, respectivamente) y ratas machos (B y D, respectivamente) adultas control y tratadas con hormonas sexuales durante las primeras horas de vida postnatal. Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM de animales control (Hembras = 10, Machos = 5), EV (Hembras = 9, Machos = 5), TP (Hembras = 10, Machos = 6) y DHT (Hembras = 5, Machos = 3). El análisis estadístico fue realizado a través de una ANOVA de una cola post-test Newman-Keuls. (***) $P < 0.001$, (**) $P < 0.01$, (*) $P < 0.05$.

5.5.2) Contenido de 5-HT y 5-HIAA al PND60 en SL de ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT.

Respecto al contenido de 5-HT en SL de ratas hembras se observó una disminución estadísticamente significativa ratas adultas tratadas durante las primeras horas de vida postnatal con EV y TP, respecto a ratas hembras control. Mientras que en las ratas hembras tratadas con DHT no se observaron diferencias estadísticamente significativas (ver gráfico 6, panel A). Por el contrario, en ratas machos tratados durante las primeras horas de vida con TP y DHT se observó un aumento estadísticamente significativo del contenido de 5-HT en SL, respecto a ratas machos control. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el contenido de 5-HT de ratas machos EV (Ver gráfico 6, panel B).

En cuanto al contenido del principal metabolito de 5-HT el 5-HIAA, se observó en ratas hembras EV un aumento estadísticamente significativo de su contenido en SL, respecto ratas hembras control (ver gráfico 6, panel C). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ratas hembras tratadas durante las primeras horas de vida postnatal con TP y DHT (ver gráfico 6, panel C). En ratas machos tratadas con EV, TP y DHT se observó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de 5-HIAA, respecto ratas machos control (ver gráfico 6, panel D).

Gráfico 6

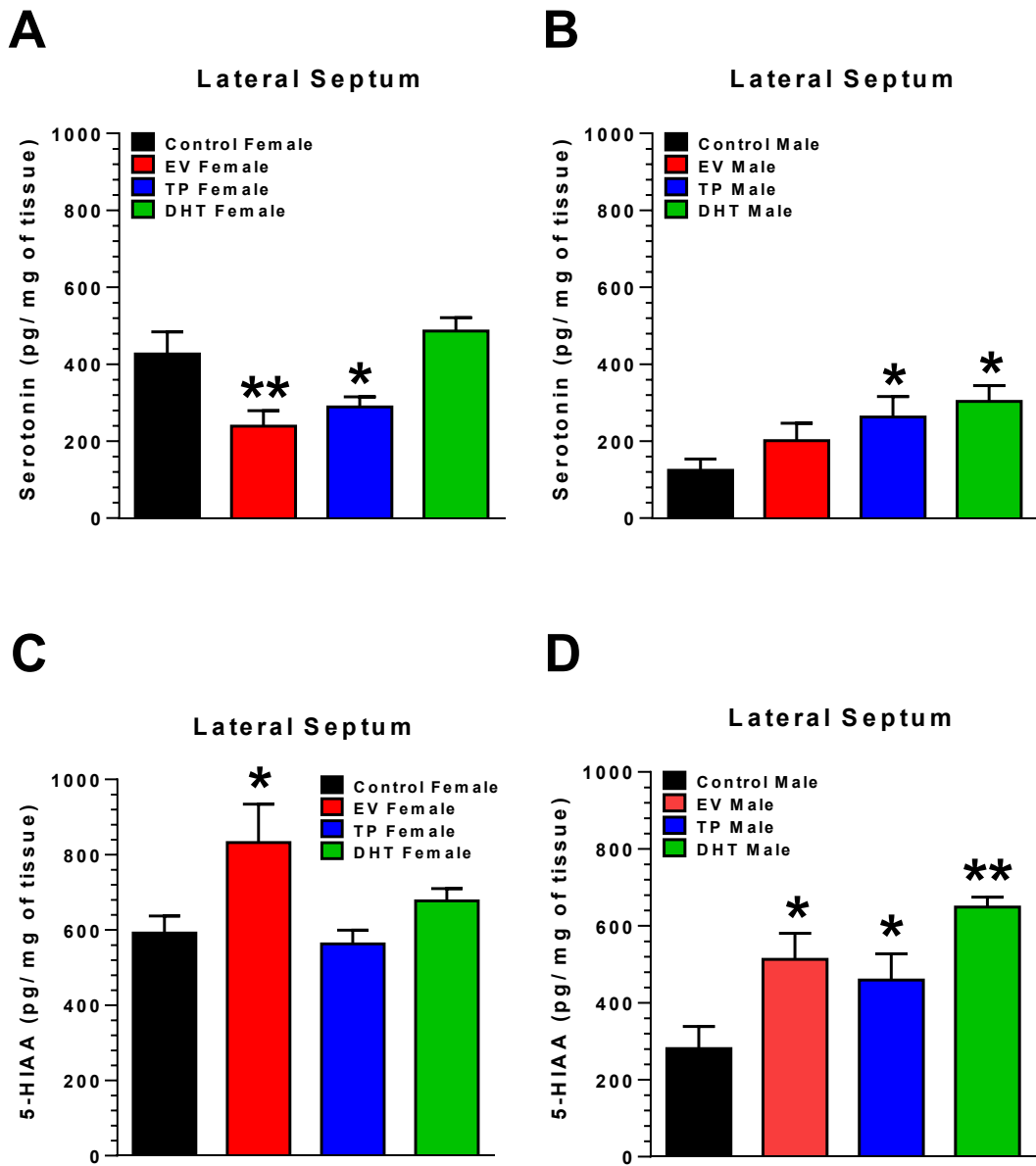


Gráfico 6: El gráfico 6 nos muestra en contenido de 5-HT y 5-HIAA en SL de hembras (A y C, respectivamente) y ratas machos (B y D, respectivamente) adultas control y tratadas con hormonas sexuales durante las primeras horas de vida postnatal. Los resultados son expresado como el promedio \pm EEM de animales control (Hembras = 10, Machos = 5), EV (Hembras = 9, Machos = 5), TP (Hembras = 10, Machos = 6) y DHT (Hembras = 5, Machos = 3). El análisis estadístico fue realizado a través de una ANOVA de una cola post-test Newman-Keuls. (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

5.5.3) Contenido de NA al PND60 en SL de ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT.

El contenido de NA en SL de ratas hembras al PND60 tratadas durante las primeras horas de vida solo disminuyó significativamente en ratas hembras TP, respecto a ratas hembras control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ratas hembras tratadas con EV y DHT (ver gráfico 7, panel A). Respecto a ratas machos adultos, el contenido de NA aumentó significativamente solo en ratas machos TP, respecto a ratas machos control (ver gráfico 7, panel B).

Gráfico 7

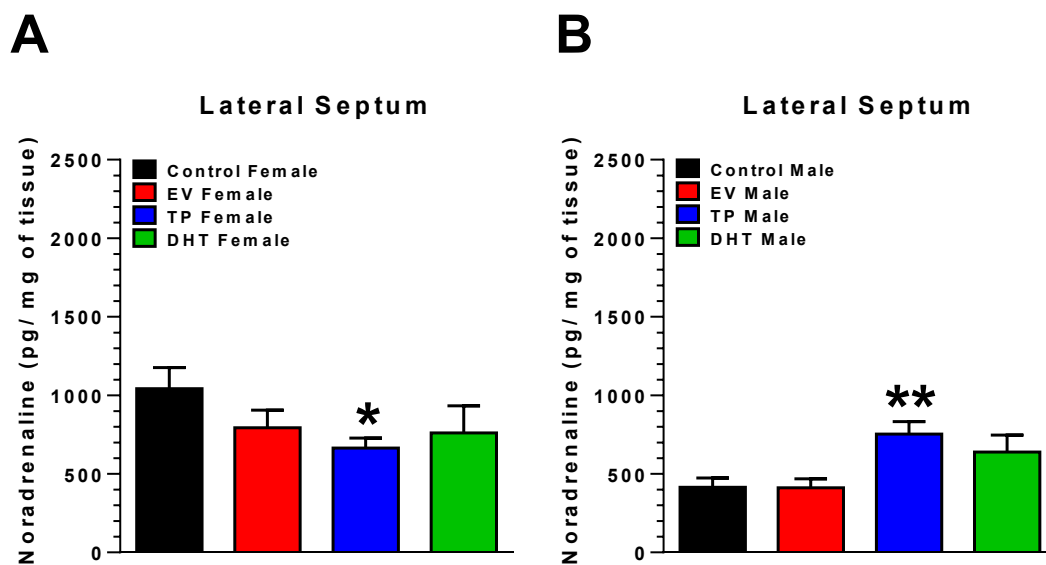


Gráfico 7: El gráfico 7 nos muestra el contenido de NA en SL de hembras (A) y ratas machos (B) adultos control y tratadas con hormonas sexuales durante las primeras horas de vida postnatal. Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM de animales control (Hembras = 10, Machos = 5), EV (Hembras = 9, Machos = 5), TP (Hembras = 10, Machos = 6) y DHT (Hembras = 5, Machos = 3). El análisis estadístico fue realizado a través de una ANOVA de una cola post-test Newman-Keuls. (**P < 0.01, *P < 0.05).

5.5.4) Razón de Recaptación ([Metabolito]/[Neurotransmisor]) en SL de ratas adultas con exposición neonatal a EV, TP y DHT.

La razón de recaptación es una medida que permite evaluar cualitativamente si los cambios en contenido de neurotransmisores pueden darse por un aumento de la síntesis, cambios en la metabolización o ambas situaciones. En hembras DHT se observa que la disminución significativa en el cociente (DOPAC/DA) refleja claramente una mayor síntesis del neurotransmisor sin afectar la tasa metabólica. Sin embargo el aumento significativo de cociente (DOPAC/DA) en ratas machos EV refleja una aumentada metabolización asociada a una mayor recaptación. El aumento significativo del cociente (5-HIAA/5-HT) en ratas hembras EV se asocia a una mayor metabolización de la 5-HT por mayor recaptación.

Tabla 1

Condición	DOPAC/DA	Condición	DOPAC/DA
Hembra Control	1.56 ± 0.21	Macho Control	1.19 ± 0.06
Hembra EV	2.28 ± 0.45	Macho EV	4.36 ± 0.74 ***
Hembra TP	1.59 ± 0.13	Macho TP	2.42 ± 0.40
Hembra DHT	0.71 ± 0.05 *	Macho DHT	1.86 ± 0.36

Condición	5-HIAA/5-HT	Condición	5-HIAA/5-HT
Hembra Control	1.63 ± 0.22	Macho Control	2.51 ± 0.56
Hembra EV	4.41 ± 0.91 ***	Macho EV	3.33 ± 0.95
Hembra TP	2.42 ± 0.40	Macho TP	1.63 ± 0.31
Hembra DHT	1.86 ± 0.36	Macho DHT	1.65 ± 0.45

*Tabla 1: Razones de recaptación para (DOPAC/DA) y (5-HIAA/5-HT) ratas de ambos sexos control y tratadas con hormonas sexuales durante las primeras horas de vida post-natal. Los resultados son expresado como el promedio ±EEM y el análisis estadístico utilizado fue un ANOVA de una cola post-test Newman-Keuls (***P<0.001, *P<0.05).*

5.6) Resultados Celulares.

5.6.1) Expresión de TH en SL de ratas adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales. Experimentos de Western Blot.

Mediante la técnica Western Blot, se cuantificó la expresión de la enzima TH al PND 60 en SL de ratas machos y hembras adultas control y tratadas al PND 1 con EV, TP y DHT. Los resultados obtenidos nos demuestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de TH en SL de ratas machos tratadas con hormonas sexuales, respecto a ratas machos control (gráfico 8). Sin embargo, solo en ratas hembras EV se observó un aumento significativo en la expresión de TH al PND 60, respecto a ratas hembras control (gráfico 9).

Gráfico 8

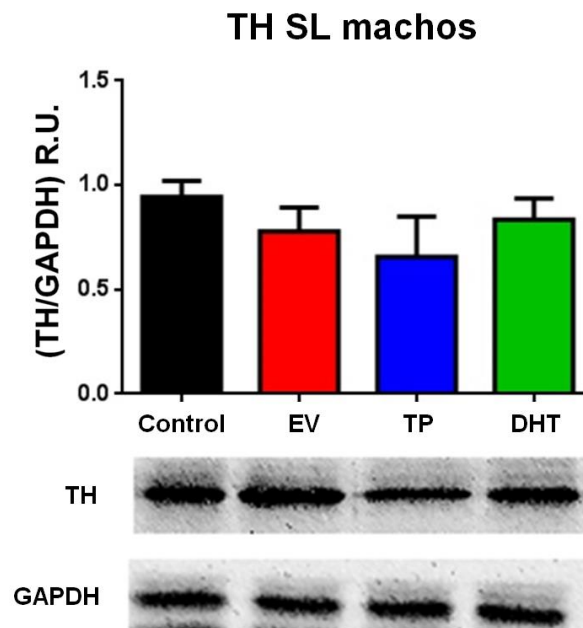


Gráfico 8: El gráfico 8 muestra los cambios en los niveles de expresión de TH en SL de ratas machos adultos control y tratadas durante las primeras horas de vida post-natal con hormonas sexuales (EV, TP y DHT). Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM y el análisis estadístico fue realizado a través de un ANOVA de una cola post-test Tukey. Machos control (n = 5), Machos EV (n = 5), Machos TP (n = 5) y Machos DHT (n = 5). R.U.: Unidades relativas.

Gráfico 9

TH SL hembras

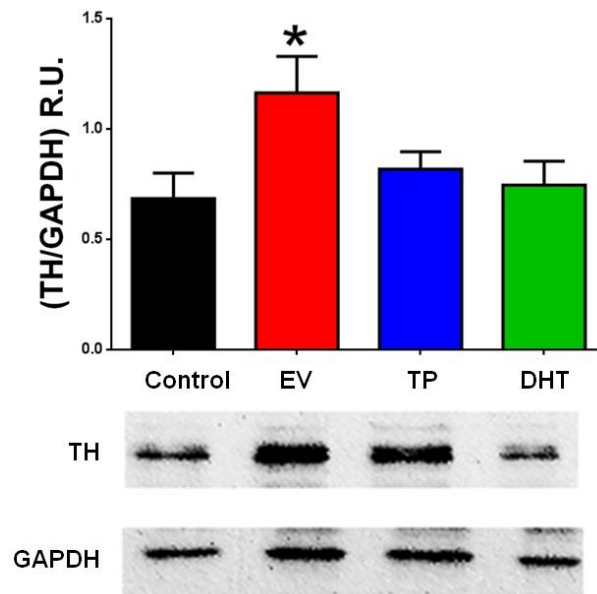


Gráfico 9: El gráfico 9 muestra los cambios en los niveles de expresión de TH en SL de ratas hembras adultas control y tratadas durante las primeras horas de vida post-natal con hormonas sexuales (EV, TP y DHT). Los resultados son expresados como el promedio \pm EEM y el análisis estadístico fue realizado a través de un ANOVA de una cola post-test Tukey (* $P < 0.05$). Hembras control ($n = 5$), Hembras EV ($n = 5$), Hembras TP ($n = 5$) y Hembras DHT ($n = 5$). R.U.: Unidades relativas.

6) DISCUSIÓN

Dentro de los efectos producidos y descritos en esta tesis, se pudo observar que las ratas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV, TP y DHT se producen cambios significativos a largo plazo, tanto en tejidos periféricos como en el SNC. En ratas de ambos sexos la exposición neonatal a hormonas sexuales produce una disminución significativa del tamaño de las gónadas, reflejando que los efectos a largo plazo son perdurables. A pesar que no se midieron cambios epigénéticos en nuestros animales, los cambios antes descritos en órganos periféricos, así como los observados en SL deberían estar asociados a cambios en la expresión de genes inducidos por la exposición postnatal a las hormonas. Por ejemplo, se ha observado en la literatura que la exposición neonatal a E_2 disminuye en ratas hembras adultas el porcentaje de metilación del ESR1 ($Er\alpha$) y ESR2 ($Er\beta$) en hipotálamo anterior e hipotálamo mediobasal, respectivamente [60]. Esta disminución en el porcentaje de metilación de los genes de los ERs podría favorecer una mayor expresión de estas proteínas. Además, como demostramos previamente los niveles plasmáticos de E_2 no se afectan en ratas adultas expuestas a EV al PND 1 [58], lo que podría llevarnos a suponer que al haber mayores niveles de expresión de los receptores y niveles de ligando normales se podría favorecer la expresión de genes en tejidos sensibles a la acción de estrógenos, como en tejidos reproductivos y no reproductivos.

6.1) Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre el contenido de DA en SL.

El circuito mesocorticolímbico es una de las vías dopaminérgicas que ha sido

asociado a los efectos placenteros de recompensantes naturales y de drogas de abuso [61]. A pesar que este circuito está conformado principalmente por neuronas dopaminérgicas del VTA y sus proyecciones hacia NAcc y CPF, otros núcleos cerebrales han demostrado participar activamente en modular el disparo de estas neuronas dopaminérgicas, a través de activarlas directamente o a través de modular a las interneuronas GABAérgicas del VTA que las regulan. Así por ejemplo se ha demostrado que el SL tiene mecanismos regulatorios en la liberación de DA similares a los observados en NAcc [62] y que su conectividad directa o indirecta (a través de hipotálamo lateral) con VTA puede regular la actividad de sus neuronas dopaminérgicas y las respuestas conductuales a drogas de abuso [63,64]. Respecto a las neuronas dopaminérgicas, uno de sus principales marcadores neuronales es la expresión de la TH y estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la expresión de esta enzima en animales adultos se ve aumentada por la exposición neonatal a hormonas sexuales [22]. Por otro lado, un estudio reciente ha demostrado que la TH puede ser cuantificada por inmunoblots en SL [65]. Sin embargo, las modificaciones en la expresión de esta enzima en SL, utilizando nuestro modelo experimental no ha sido estudiado previamente. En este sentido, los resultados de esta tesis nos muestran que la expresión de la TH en SL solo aumenta significativamente en ratas hembras EV respecto a ratas hembras control. Este resultado es congruente con nuestros resultados previos en que observamos cambios similares en la expresión de TH en ratas hembras EV a nivel de SN y VTA (datos no publicados). Sin embargo, estos resultados previos fueron realizados usando la técnica de inmunohistoquímica y nos permitió observar también un aumento significativo en la expresión de TH en ratas machos EV [22], lo que no pudo

ser observado en esta tesis a nivel de SL de ratas machos EV y TP. Esta diferencia puede ser debida a que en los estudios por inmunohistoquímica se cuantificó la expresión de la TH específicamente en un área neuroanatómica adyacente al tracto óptico accesorio que un cerebro de rata se observa en 3 a 4 cortes de 30 μm de espesor (contando somas de neuronas con inmunoreactividad positiva para TH), mientras que en los estudios de western blots en SL se extrae un área total de 2 mm de espesor en que otros grupos celulares pueden contribuir a diluir la expresión total de la TH, evitando observar cambios significativos respecto a ratas control.

Los resultados de esta tesis demuestran que la administración de hormonas sexuales en etapas tempranas del desarrollo afecta la neuroquímica monoaminérgica del SL. Respecto al contenido de DA en SL se observó un aumento significativo en ratas hembras y machos adultas tratadas con DHT al PND1. Cabe señalar que este aumento en el contenido de DA no fue observado previamente en ratas tratadas con DHT [22], aunque las mediciones del contenido tisular de DA fueron realizados en SN y VTA. Una posible explicación para estos resultados puede deberse a que la DHT es un andrógeno no aromatizable más potente que la T en estimular los AR. En este sentido el SL es una de las áreas cerebrales que mayormente expresa AR [48] y su expresión es inducible por estímulos deletéreos en etapas tempranas del desarrollo. Por ejemplo, se ha demostrado recientemente que la administración neonatal de mifepristona, un antagonista de receptores de progesterona, aumenta la expresión de AR en SL de ratas machos adultas [66]. Adicionalmente, la monoamino oxidasa (MAO), enzima clave en la metabolización de neurotransmisores monoaminérgicos y responsable de la formación de DOPAC, es inducible su expresión por andrógenos. Así por ejemplo se ha observado que en

macacos la expresión de MAO isoforma A (MAO-A) aumenta en NRD de animales tratados con DHT versus animales control [67]. En este sentido, el aumento de DOPAC y 5-HIAA observado en ratas machos DHT podría ser causado por un aumento en la expresión de la MAO a nivel del SL.

6.2) Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre el contenido de 5-HT en SL.

El sistema de la 5-HT ha sido asociado a un amplio espectro de efectos fisiológicos en el sistema nervioso central, por lo que alteraciones en este sistema han sido relacionadas con varias enfermedades neuropsiquiátricas. Las neuronas que contienen 5-HT están principalmente localizadas en los NRD y medial (NRM), y en menor medida en el *locus coeruleus*. El NRD presenta una conexión bidireccional con el SL y se ha evidenciado que también puede ser neuromodulado por hormonas sexuales [68], así por ejemplo se ha demostrado que la administración de E_2 produce un aumento en el transportador de 5-HT en SL de ratas hembras [69]. En este sentido, en esta tesis la disminución del contenido de 5-HT observado en ratas hembras tratadas con EV y TP, podría deberse a una mayor recaptación de 5-HT en SL. Por otro lado, la administración de TP y DHT produjo un aumento significativo del contenido de 5-HT en SL, lo que podría explicarse por una inhibición de la recaptación de 5-HT inducida por la androgenización neonatal en área cerebral que expresa mayormente AR. Adicionalmente, a nivel metabólico la enzima MAO-A también cataboliza 5-HT y es responsable de la formación de 5-HIAA [67], por lo que el aumento en este metabolito en SL podría deberse a un aumento en la expresión de esta enzima.

6.3) Efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre el contenido de NA en SL.

La NA pertenece al grupo de los neurotransmisores denominados catecolaminas. Las catecolaminas secretadas por el sistema nervioso simpático y la médula suprarrenal participan en procesos de diversas funciones, en particular frente a situaciones de estrés que requieren respuestas integrativas de varios sistemas fisiológicos, como el cardiovascular, respiratorio, etc. [70]. Las hormonas sexuales administradas en los primeros días de vida producen en áreas mesencefálicas un aumento en el contenido de NA en ratas hembras adultas [58], que podría deberse a un aumento de la expresión de TH en SN y VTA, como fue observado en ratas machos [22]. Esta evidencia puede ayudarnos a entender los resultados observados en ratas machos TP adultas a nivel de SL, mientras en ratas hembras TP se observó una disminución significativa del contenido de NA en SL respecto al control, por lo que estos resultados podrían explicarse mediante la conversión de TP a EV a través de la enzima aromatasa o a una inducción metabólica. Sin embargo, experimentos posteriores serán necesarios para confirmar las teorías anteriores.

7) CONCLUSIONES

- * La administración de hormonas sexuales al PND1 produce a largo plazo alteraciones en tejidos sensibles a la acción de las hormonas en ratas machos y hembras. Por ejemplo en la periferia, las gónadas se ven afectadas a largo plazo y a nivel del SNC cambios neuroquímicos persistentes. En este sentido, la administración neonatal de DHT produce un aumento significativo de DA en SL en ratas machos y hembras adultas.
- * Los niveles de DOPAC, principal metabolito de la DA en rata, se afectó significativamente al PND60 en ratas machos expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a EV y DHT.
- * El contenido de 5-HT en SL disminuyó significativamente con la administración neonatal de EV y TP en ratas hembras adultas, mientras que en ratas machos adultas la administración neonatal de TP y DHT produjo un aumento. Por otro lado, el contenido de 5-HIAA en SL aumento en ratas hembras EV, mientras que la administración de las tres hormonas (EV, TP y DHT) en ratas machos aumentó el contenido de 5-HIAA en SL.
- * El contenido de NA en SL de ratas hembras TP disminuyó significativamente, mientras que en machos TP se observó el efecto contrario.
- * El efecto de la administración de EV al PND1 produce un aumento en los niveles de expresión de TH en SL de ratas hembras, mientras que la administración neonatal de TP y DHT no afecta la expresión de esta enzima.

8) BIBLIOGRAFÍA:

- [1] McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 357-384.
- [2] Belcher SM, Zsarnovszky A. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 408-414.
- [3] Hall JE. "Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica" Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2011.
- [4] Ganong WF. *Fisiología Médica*. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, México; 2006.
- [5] Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. Barcelona, España: Elsevier España, S.L.; 2011.
- [6] Lephart ED. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 61: 375-380.
- [7] Celotti F, Melcangi RC, Martini L. The 5 alpha-reductase in the brain: molecular aspects and relation to brain function. *Front Neuroendocrinol* 1992; 13: 163-215.
- [8] Lenz B, Muller CP, Stoessel C, Sperling W, Biermann T, Hillemacher T *et al*. Sex hormone activity in alcohol addiction: integrating organizational and activational effects. *Prog Neurobiol* 2012; 96: 136-163.
- [9] Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* 1999; 246: 133-138.
- [10] Ravizza T, Veliskova J, Moshe SL. Testosterone regulates androgen and estrogen receptor immunoreactivity in rat substantia nigra pars reticulata. *Neurosci Lett* 2003; 338: 57-61.
- [11] Creutz LM, Kritzer MF. Mesostriatal and mesolimbic projections of midbrain neurons immunoreactive for estrogen receptor beta or androgen receptors in rats. *The Journal of comparative neurology* 2004; 476: 348-362.
- [12] Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology* 1990; 294: 76-95.
- [13] Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 1997; 388: 507-525.
- [14] Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 70-84.
- [15] Ramirez VD, Zheng J. Membrane sex-steroid receptors in the brain. *Front Neuroendocrinol* 1996; 17: 402-439.
- [16] Morikawa H, Paladini CA. Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 2011; 198: 95-111.
- [17] Yoest KE, Cummings JA, Becker JB. Estradiol, dopamine and motivation. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 2014; 14: 83-89.

- [18] Becker JB, Ramirez VD. Sex differences in the amphetamine stimulated release of catecholamines from rat striatal tissue in vitro. *Brain Res* 1981; 204: 361-372.
- [19] Sotomayor-Zarate R, Cruz G, Renard GM, Espinosa P, Ramirez VD. Sex hormones and brain dopamine functions. *Central nervous system agents in medicinal chemistry* 2014; 14: 62-71.
- [20] Johnson ML, Ho CC, Day AE, Walker QD, Francis R, Kuhn CM. Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain. *Journal of neuroendocrinology* 2010; 22: 226-237.
- [21] Johnson ML, Day AE, Ho CC, Walker QD, Francis R, Kuhn CM. Androgen decreases dopamine neurone survival in rat midbrain. *Journal of neuroendocrinology* 2010; 22: 238-247.
- [22] Espinosa P, Silva RA, Sanguinetti NK, Venegas FC, Riquelme R, Gonzalez LF *et al.* Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats. *Neural plasticity* 2016; 2016: 4569785.
- [23] Chavez C, Hollaus M, Scarr E, Pavey G, Gogos A, van den Buuse M. The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study. *Brain Res* 2010; 1321: 51-59.
- [24] Morissette M, Di Paolo T. Effect of chronic estradiol and progesterone treatments of ovariectomized rats on brain dopamine uptake sites. *J Neurochem* 1993; 60: 1876-1883.
- [25] Bosse R, Rivest R, Di Paolo T. Ovariectomy and estradiol treatment affect the dopamine transporter and its gene expression in the rat brain. *Brain research Molecular brain research* 1997; 46: 343-346.
- [26] Le Saux M, Di Paolo T. Influence of oestrogenic compounds on monoamine transporters in rat striatum. *Journal of neuroendocrinology* 2006; 18: 25-32.
- [27] Lammers CH, D'Souza U, Qin ZH, Lee SH, Yajima S, Mouradian MM. Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen. *Synapse* 1999; 34: 222-227.
- [28] Sarvari M, Deli L, Kocsis P, Mark L, Maasz G, Hrabovszky E *et al.* Estradiol and isotype-selective estrogen receptor agonists modulate the mesocortical dopaminergic system in gonadectomized female rats. *Brain Res* 2014; 1583: 1-11.
- [29] Sarvari M, Hrabovszky E, Kallo I, Galamb O, Solymosi N, Liko I *et al.* Gene expression profiling identifies key estradiol targets in the frontal cortex of the rat. *Endocrinology* 2010; 151: 1161-1176.
- [30] Sarvari M, Kallo I, Hrabovszky E, Solymosi N, Toth K, Liko I *et al.* Estradiol replacement alters expression of genes related to neurotransmission and immune surveillance in the frontal cortex of middle-aged, ovariectomized rats. *Endocrinology* 2010; 151: 3847-3862.
- [31] McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine reviews* 1999; 20: 279-307.
- [32] Woolley CS, McEwen BS. Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci* 1994; 14: 7680-7687.

- [33] Daubert EA, Condrón BG. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends in neurosciences* 2010; 33: 424-434.
- [34] Serfaty CA, Oliveira-Silva P, Faria Melibeu Ada C, Campello-Costa P. Nutritional tryptophan restriction and the role of serotonin in development and plasticity of central visual connections. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 170-175.
- [35] Monti JM. The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep medicine reviews* 2010; 14: 307-317.
- [36] Dominguez R, Cruz-Morales SE, Carvalho MC, Xavier M, Brandao ML. Effect of steroid injection to newborn rats on serotonin activity in frontal cortex and raphe. *Neuroreport* 2003; 14: 597-599.
- [37] Ahlman H, Bhargava HN, Dahlstrom A, Larsson I, Newson B, Pettersson G. On the presence of serotonin in the gut lumen and possible release mechanisms. *Acta physiologica Scandinavica* 1981; 112: 263-269.
- [38] Gershon MD, Sherman DL, Pintar JE. Type-specific localization of monoamine oxidase in the enteric nervous system: relationship to 5-hydroxytryptamine, neuropeptides, and sympathetic nerves. *The Journal of comparative neurology* 1990; 301: 191-213.
- [39] Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H *et al.* Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003; 301: 386-389.
- [40] Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain research Brain research reviews* 2004; 46: 71-117.
- [41] Cavazos JE, Wang CJ, Sitoh YY, Ng SE, Tien RD. Anatomy and pathology of the septal region. *Neuroimaging clinics of North America* 1997; 7: 67-78.
- [42] Adams BW, Moghaddam B. Tactile stimulation activates dopamine release in the lateral septum. *Brain Res* 2000; 858: 177-180.
- [43] Alonso JR, Frotscher M. Hippocampo-septal fibers terminate on identified spiny neurons in the lateral septum: a combined Golgi/electron-microscopic and degeneration study in the rat. *Cell and tissue research* 1989; 258: 243-246.
- [44] Gaspar P, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Henry JP. Catecholaminergic innervation of the septal area in man: immunocytochemical study using TH and DBH antibodies. *The Journal of comparative neurology* 1985; 241: 12-33.
- [45] Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews* 1992; 72: 165-229.
- [46] Jakab RL, Leranath C. Catecholaminergic, GABAergic, and hippocamposeptal innervation of GABAergic "somatospiny" neurons in the rat lateral septal area. *The Journal of comparative neurology* 1990; 302: 305-321.
- [47] Jakab RL, Leranath C. Presence of somatostatin or neurotensin in lateral septal dopaminergic axon terminals of distinct hypothalamic and midbrain origins: convergence on the somatospiny neurons. *Experimental brain research* 1993; 92: 420-430.

- [48] Handa RJ, Roselli CE, Horton L, Resko JA. The quantitative distribution of cytosolic androgen receptors in microdissected areas of the male rat brain: effects of estrogen treatment. *Endocrinology* 1987; 121: 233-240.
- [49] Romano-Torres M, Phillips-Farfan BV, Chavira R, Rodriguez-Manzo G, Fernandez-Guasti A. Relationship between sexual satiety and brain androgen receptors. *Neuroendocrinology* 2007; 85: 16-26.
- [50] Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156: 38-50; discussion 50-35.
- [51] Davies MJ, Norman RJ. Programming and reproductive functioning. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 386-392.
- [52] Gorski RA. Influence of age on the response to paranatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology* 1968; 82: 1001-1004.
- [53] Sotomayor-Zarate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara HE. Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat. *Fertility and sterility* 2011; 96: 1490-1496.
- [54] Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, Jara P, Dagnino-Subiabre A, Renard GM *et al*. Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2014; 46: 322-327.
- [55] Sundblad C, Eriksson E. Reduced extracellular levels of serotonin in the amygdala of androgenized female rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997; 7: 253-259.
- [56] King JA, Barkley RA, Delville Y, Ferris CF. Early androgen treatment decreases cognitive function and catecholamine innervation in an animal model of ADHD. *Behav Brain Res* 2000; 107: 35-43.
- [57] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. 2005.
- [58] Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, Jara P, Dagnino-Subiabre A, Renard GM *et al*. Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 2014; 46: 322-327.
- [59] Centola GM. Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy. *J Anat* 1978; 127: 553-561.
- [60] Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* 2010; 151: 4871-4881.
- [61] Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American journal of psychiatry* 2005; 162: 1403-1413.
- [62] Sotomayor R, Forray MI, Gysling K. Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic

- inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res* 2005; 81: 132-139.
- [63] Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, Lupica CR, Aston-Jones G. Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* 2011; 333: 353-357.
- [64] Sartor GC, Aston-Jones GS. A septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons, which is necessary for conditioned cocaine preference. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012; 32: 4623-4631.
- [65] Renard GM, Sotomayor-Zarate R, Blanco EH, Gysling K. Withdrawal from chronic amphetamine reduces dopamine transmission in the rat lateral septum. *J Neurosci Res* 2014; 92: 937-943.
- [66] Forbes-Lorman R, Auger AP, Auger CJ. Neonatal RU-486 (mifepristone) exposure increases androgen receptor immunoreactivity and sexual behavior in male rats. *Brain Res* 2014; 1543: 143-150.
- [67] Bethea CL, Phu K, Kim A, Reddy AP. Androgen metabolites impact CSF amines and axonal serotonin via MAO-A and -B in male macaques. *Neuroscience* 2015; 301: 576-589.
- [68] Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Frontiers in neuroscience* 2015; 9: 37.
- [69] Debiec J, Bush DE, LeDoux JE. Noradrenergic enhancement of reconsolidation in the amygdala impairs extinction of conditioned fear in rats—a possible mechanism for the persistence of traumatic memories in PTSD. *Depression and anxiety* 2011; 28: 186-193.
- [70] Aston-Jones G, Rajkowski J, Cohen J. Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 1309-1320.