



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE TESTOSTERONA PROPIONATO Y  
DIHIDROTESTOSTERONA AFECTA LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA DE LA  
RATA HEMBRA Y MACHO ADULTA. IMPLICANCIAS EN EL DESARROLLO DE LA CONDUCTA  
ADICTIVA.**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**PEDRO ALEJANDRO ESPINOSA AHUMADA**

Director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**

**2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento obtenido por el **Proyecto FONDECYT N° 111-21205** del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate y de la **Iniciativa Científica Milenio Proyecto N° P10/063-F**.

Parte de los resultados de esta tesis y otros estudios realizados en el “Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología” me han permitido publicar dos trabajos originales en las Revistas *Hormone and Metabolic Research* (Horm Metab Res. 2014 May; 46(5):322-7) y *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology* (Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2014 May; 114(5):395-9). Además, estos resultados han sido presentados en el XXXV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile y en el 17° Congreso Mundial de Farmacología en Ciudad del Cabo, Sudáfrica.

## INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
Antecedentes Epidemiológicos.....	10
Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales.....	11
Circuito de la Recompensa Cerebral:.....	12
Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales.....	14
<i>Síntesis y Metabolismo de la Testosterona: .....</i>	<i>14</i>
<i>Reprogramación Neonatal con Andrógenos y sus Efectos a Largo Plazo en el Cerebro.....</i>	<i>16</i>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
Objetivo General:.....	19
Objetivos Específicos: .....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
Animales:.....	23
Reactivos:.....	23
Administración de TP y DHT:.....	24
Registro del Ciclo Estral:.....	25
Enzimo Inmunoanálisis (EIA) para Hormonas Sexuales en Suero:.....	25
Extracción de Tejidos: .....	26
Homogenización de Tejidos Cerebrales:.....	26
Microdiálisis Cerebral <i>in vivo</i> : .....	27
<i>Preparación del Animal: .....</i>	<i>27</i>
<i>Cirugía e Implantación de Cánula de Microdiálisis:.....</i>	<i>28</i>
<i>Protocolos de Recolección de Muestras de Microdiálisis. ....</i>	<i>29</i>
Determinación de DA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a Detección Electroquímica: .....	33
Actividad Locomotora:.....	34
Cálculos y Análisis Estadístico: .....	35

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
Caracterización del Modelo de Androgenización Neonatal .....	36
<i>Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva:.....</i>	<i>36</i>
<i>Actividad Cíclica Estral:.....</i>	<i>37</i>
<i>Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Androgénicas: .....</i>	<i>38</i>
Niveles Séricos de Progesterona y Estradiol en Hembras expuestas a TP.....	43
Contenido de DA en SN-VTA y Cuerpo Estriado. Liberación de DA Basal y Estimulada por K <sup>+</sup> (70 mM) en NAcc. Estudios Neuroquímicos en Hembras .....	45
Contenido de DA en SN-VTA y Cuerpo Estriado. Liberación de DA Basal y Estimulada por K <sup>+</sup> (70 mM) en NAcc. Estudios Neuroquímicos en Machos.....	47
Liberación de DA en NAcc inducida por la Administración de Anfetamina Intra-NAcc y Sistémica al DPN-60 de Ratras Hembra Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos.....	49
Actividad Locomotora inducida por la Administración de Anfetamina Sistémica al DPN-60 de Ratras Hembras Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos. ....	51
Liberación de DA en NAcc inducida por la Administración de Anfetamina Intra-NAcc y Sistémica al DPN-60 de Ratras Macho Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos.....	53
Actividad Locomotora inducida por la Administración de Anfetamina Sistémica al DPN-60 de Ratras Machos Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos. ....	55
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
1) Caracterización de la Androgenización Neonatal.....	57
1.1) <i>Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de Andrógenos en Hembras:.....</i>	<i>57</i>
1.2) <i>Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de Andrógenos en Machos: .....</i>	<i>59</i>
2) Efectos de la Administración Neonatal a Andrógenos en Áreas Cerebrales relacionadas con Motivación y Locomoción.....	61
2.1) <i>Efectos en el Contenido de DA en SN-VTA y CE de Ratras Hembras Androgenizadas: .....</i>	<i>61</i>
2.2) <i>Efectos en el Contenido de DA en SN-VTA y CE de Ratras Machos Androgenizadas: .....</i>	<i>62</i>
2.3) <i>Efectos de la Administración Neonatal de Andrógenos Sobre la Liberación de DA en NAcc de Ratras Hembras Adultas: .....</i>	<i>64</i>
2.4) <i>Efectos de la Administración Neonatal de Andrógenos Sobre la Liberación de DA en NAcc de Ratras Machos Adultas:.....</i>	<i>65</i>
2.5) <i>Efectos de la Administración Neonatal de Andrógenos Sobre la Actividad Locomotora de Ratras Adultas:.....</i>	<i>67</i>
3) Cambios Epigenéticos y Proyecciones a Futuro.....	69
3.1) <i>Efectos Epigenéticos a Largo Plazo Mediado por Hormonas Sexuales:.....</i>	<i>69</i>

3.2) *Contaminantes Ambientales y Efectos a Largo Plazo*:.....70

3.3) *Proyecciones Futuras*:.....71

**CONCLUSIONES** .....72

**BIBLIOGRAFÍA** .....74

## RESUMEN

En esta tesis se estudiaron los efectos neuroquímicos de la administración neonatal de testosterona propionato y dihidrotestosterona en el contenido y liberación de dopamina en áreas nigroestriatales (Sustancia Nigra y Cuerpo Estriado) y mesolímbicas (Área Tegmental Ventral y Núcleo Accumbens) de ratas hembras y machos adultas. A nivel conductual, se midió la actividad locomotora basal e inducida por anfetamina en ratas adultas como una medida funcional de los efectos de la administración neonatal de andrógenos. Como grupo control se utilizaron ratas neonatas a las que se les administró aceite de maíz, que es el vehículo de disolución de los andrógenos.

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la administración neonatal de testosterona propionato produjo un aumento significativo en el contenido de dopamina en Sustancia Nigra-Área Tegmental Ventral de ratas machos adultas. Sin embargo, el contenido de dopamina en Cuerpo Estriado no se afectó en los mismos animales. Por otro lado, sólo se observó que en ratas hembras adultas la administración neonatal de dihidrotestosterona produjo una disminución significativa del contenido de dopamina en Sustancia Nigra-Área Tegmental Ventral.

Respecto a los resultados de liberación de dopamina en Núcleo Accumbens, sólo se observó un aumento significativo inducido con la perfusión de  $K^+$  70 mM en ratas hembras adultas androgenizadas con testosterona propionato. A nivel funcional, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la actividad locomotora inducida por una dosis de anfetamina en ratas hembras y machos adultas expuestas a andrógenos.

En conclusión estos resultados demuestran que el periodo del desarrollo neonatal es sensible a disruptores endocrinos, que pueden producir efectos deletéreos a largo plazo.

## **ABSTRACT**

This thesis studied the neurochemicals effects of neonatal exposure to testosterone propionate and dihydrotestosterone on the content and dopamine release in some brain areas such as Nigrostriatal (Substantia Nigra and Striatum) and mesolimbic (Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens) pathways in adult female and male rats. At behavior level locomotor activity was measured, basal and induced by amphetamine in adult rats as a functional parameter of the effects of neonatal administration of androgens. As control group we used neonatal rats that were administered sesame oil, this is the vehicle to dissolve the androgens.

Our results showed that neonatal exposure to testosterone propionate was a significant increase in the dopamine content at Substantia Nigra-Ventral Tegmental Area in male adult rats. However, the content of dopamine in Striatum wasn't affected in the same animals. Nevertheless, only in the adult female rats we observed that neonatal administration of dihydrotestosterone produced a significant decrease in the content of dopamine in Substantia Nigra-Ventral Tegmental Area.

According to dopamine release results in Nucleus Accumbens, we only observe a significant increase of dopamine release induced by perfusion of  $K^+$  70 mM in the androgenized female rats with testosterone propionate.

At functional level, we did not observe any statistically significant changes in the locomotor activity induced by a dose of amphetamine in the female and male adult rats exposed to androgens.

In conclusion, these results demonstrate that the period of neonatal development is very sensitive to exogenous stimuli, such as endocrine disruptors, that may produce long-term deleterious effects.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Antecedentes Epidemiológicos**

El consumo de drogas es una problemática a nivel mundial, así lo indica la Oficina de Naciones Unidas contra las Drogas y el Delito (UNODC por su sigla en inglés), la cual ha estimado que unos 300 millones de personas (el 5% de la población adulta mundial) [1], consumieron por lo menos una vez alguna droga ilícita el año 2010. Por otro lado, se estima que los consumidores problemáticos de drogas se acercan a unos 27 millones de personas (0,6% de la población del mundo) [1] y las muertes por consumo de cocaína, heroína u otras drogas son cerca de 200 mil personas al año [1].

Nuestro país no está exento de esta problemática y en Chile las cifras indican que en el grupo de jóvenes de 19 a 25 años se observa un gran alza en la prevalencia y el consumo de marihuana en el año 2012 (de un 12,3% en 2010 se incrementó a un 17,5% en 2012) siendo el promedio de dicha prevalencia de 7,1% [2]. Cabe señalar que este aumento es la cifra más alta de todos los estudios realizados desde el año 1994 al 2012 [2]. Además, la tasa de dependencia a drogas según los criterios diagnósticos de la Organización Mundial de la Salud (CIE-10) para marihuana, cocaína y pasta base, oscilan entre un 20%, 30% y un 58%, respectivamente desde el año 2006 [2]. Por este motivo es de vital importancia centrar los recursos y la investigación desde la ciencia básica en áreas como la adicción, identificando los factores de vulnerabilidad que pueden predisponer a un individuo al consumo de drogas, lo cual puede favorecer un mejor conocimiento para el desarrollo de

nuevas formas de prevención y nuevos tratamientos que puedan solucionar este problema de salud pública que afecta a millones de personas.

En esta tesis de grado se buscó dilucidar como la exposición a andrógenos en los primeros días de vida (periodo neonatal) puede afectar a largo plazo el sistema nervioso central, en especial en áreas cerebrales involucradas en conductas motivadas y en la respuesta a drogas de abuso.

### **Concepto de Reprogramación por Hormonas Sexuales.**

La reprogramación (*programming*) es definida como la redirección fisiológica de un tejido u órgano por efecto de un estímulo o daño en un período sensible del desarrollo fetal y postnatal temprano, que provoca cambios funcionales a largo plazo [3]. La importancia de esta definición es que durante el desarrollo, existen períodos críticos de vulnerabilidad (ventanas de sensibilidad) para condiciones adversas que pueden redireccionar la fisiología normal de diferentes órganos [3]. Uno de estos estímulos pueden ser las hormonas sexuales, estas tienen múltiples blancos en el organismo incluido el Sistema Nervioso Central (SNC), principalmente en los periodos críticos del desarrollo, los cuales comprenden las etapas prenatal tardía, postnatal temprana y la pubertad [4]. En estas ventanas del desarrollo los efectos de las hormonas sexuales se han asociado con la diferenciación sexual en el cerebro y tejidos periféricos, además de afectar conductas asociadas. En 1959 Phoenix y cols. [5], demostraron la primera evidencia sobre los efectos a largo plazo que los andrógenos, como la testosterona propionato (TP) producen en el SNC y sus implicancias conductuales que afectan la reproducción [5].

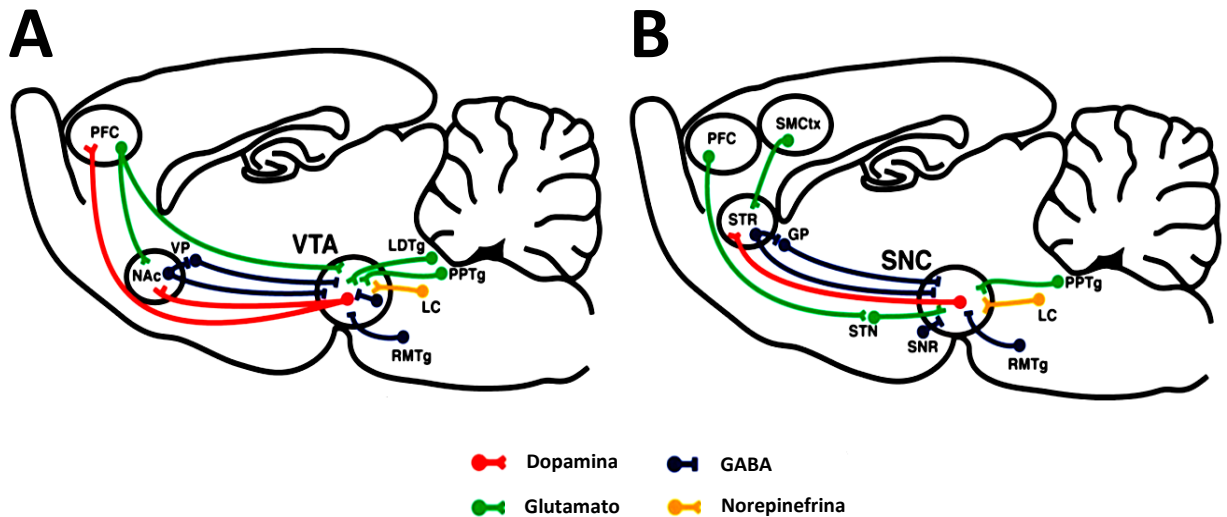
Unos años después, en la década del 60, investigadores demostraron los efectos de la TP sobre los tejidos reproductivos de la rata hembra, determinando que la exposición neonatal a 1.25mg/Kg TP (al día 2 o 5 postnatal) produjo en la adultez de la rata hembra una condición anovulatoria acompañada de la formación de quistes ováricos [6,7]. En nuestro país el grupo del Dr. Hernán Lara (Universidad de Chile) demostró en el año 2011 que la administración neonatal de hormonas sexuales, como Estradiol Valerato (EV) y TP, no solo produce en ratas hembras adultas alteraciones reproductivas, sino también alteraciones neuroquímicas en el contenido de neurotransmisores en el área Tuberoinfundibular (Hipotálamo Ventromedial-Núcleo Arcuato) [8].

### **Circuito de la Recompensa Cerebral:**

El Circuito de la Recompensa Cerebral o Circuito Mesocorticolímbico, es un circuito neuroanatómico presente en el cerebro de vertebrados, que se activa por sensaciones placenteras como el sexo, la comida y la ingesta de líquidos, entre otros [9,10]. Estos estímulos producen placer a través de la liberación de un neurotransmisor catecolaminérgico llamado dopamina (DA). La DA es un neurotransmisor sintetizado en neuronas localizadas en el Núcleo Arcuato del Hipotálamo (Sistema tuberoinfundibular), en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SN: Sistema Nigroestriatal) y en el Área Tegmental Ventral (VTA: Sistema Mesocorticolímbico). Estas neuronas dopaminérgicas sintetizan DA a través de diversas reacciones enzimáticas, cuya enzima limitante es la Tirosina Hidroxilasa (TH). La DA sintetizada en neuronas dopaminérgicas del VTA es liberada de proyecciones neuronales eferentes que llegan al Núcleo Accumbens (NAcc) y a la Corteza

Prefrontal (CPF) [11]. Las conexiones neurales entre estos núcleos forman el conocido Circuito Mesocorticolímbico [12] (ver figura 1). Este circuito regula el placer por los recompensantes naturales, como el sexo [10] y la comida [9] a través de la liberación de DA en NAcc. Sin embargo, también se ha demostrado que este circuito neuronal es el blanco de los efectos placenteros de las drogas de abuso [11,13]. En este sentido, el grupo del Dr. Gaetano Di Chiara (Universidad de Cagliari), ha demostrado a través del uso de la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo*, que prácticamente todas las drogas de abuso usadas por humanos producen un aumento en la liberación de DA en el circuito de la recompensa de la rata [14].

Figura 1:



**Vías dopaminérgicas Mesocorticolímbico (A) y Nigroestriatal (B). Figura tomada y adaptada de referencia [15].** Abreviaturas: PFC, corteza prefrontal; NAc, Núcleo Accumbens; VP, palido ventral; VTA, área tegmental ventral; LDTg, tegumento laterodorsal; PPTg, núcleo pedunculopontino tegmental; LC, locus coeruleus; RMTg, núcleo rostromedial tegmental; SMCtx, corteza somatosensorial; STR, estriado; GP, globo palido; STN, núcleo subtalámico; SNC, sustancia nigra compacta; SNR, sustancia nigra reticular.

## **Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales.**

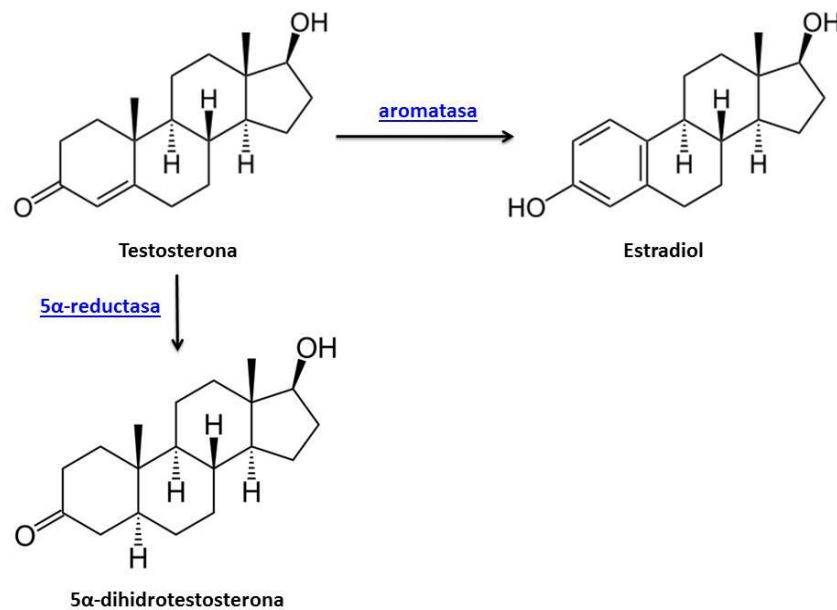
Las hormonas sexuales presentan características fisicoquímicas que las hacen ser muy lipofílicas, por este motivo son capaces de cruzar membranas biológicas y ejercer sus efectos a través de receptores citoplasmáticos. Por otro lado, esta característica permite que hormonas sexuales, tales como los andrógenos, puedan cruzar la barrera hematoencefálica y tener efectos a nivel del sistema nervioso central, por ejemplo favoreciendo la conectividad neural [16]. En este sentido, en 1959 Phoenix y cols. [5] demostraron que la administración neonatal de TP en conejillos de indias produce cambios estructurales y funcionales en el cerebro, los cuales perduran a largo plazo [5].

### **Síntesis y Metabolismo de la Testosterona:**

A nivel reproductivo, la testosterona (T) es la principal hormona sexual en el macho y es sintetizada principalmente en las células de Leydig del testículo [17], mientras que en hembras es sintetizada en las células de la teca del ovario [18]. La T es metabolizada a través de la citocromo P450 aromatasa a estradiol (E2) en las gónadas (células de Sertoli en machos y células de la granulosa en la hembra) y en tejidos no reproductivos como el adiposo, vasos sanguíneos, placenta y el cerebro, entre otros. En machos se produce otro metabolito activo de la T por acción de la citocromo P450 5- $\alpha$ -reductasa [19] que es la dihidrotestosterona (DHT), la cual es un andrógeno no aromatizable y más potente que la T (ver figura 2) [19]. La DHT tiene una afinidad tres veces mayor por los receptores de andrógenos y en la periferia es producida principalmente en la próstata, testículos, folículos pilosos y glándula adrenal [18,20].

A nivel del SNC, los efectos de la T son mediados por su reducción a DHT y en etapas tempranas del desarrollo por su aromatización a E2. En el cerebro de mamíferos existen dos isoformas de la citocromo P450 5- $\alpha$ -reductasa [21,22], donde la tipo 1 se encuentra expresada en todas las etapas del desarrollo cerebral, con similar expresión en hembras y machos [22], mientras que la tipo 2 se expresa en la fase tardía del desarrollo fetal y en período postnatal temprano sólo en machos [23]. Respecto a la expresión de aromatasa en el cerebro del macho, se ha establecido que su máximo nivel de expresión ocurre a nivel hipotalámico durante el desarrollo gestacional, disminuyendo progresivamente en recién nacidos, infantes y adultos [23].

**Figura 2:**

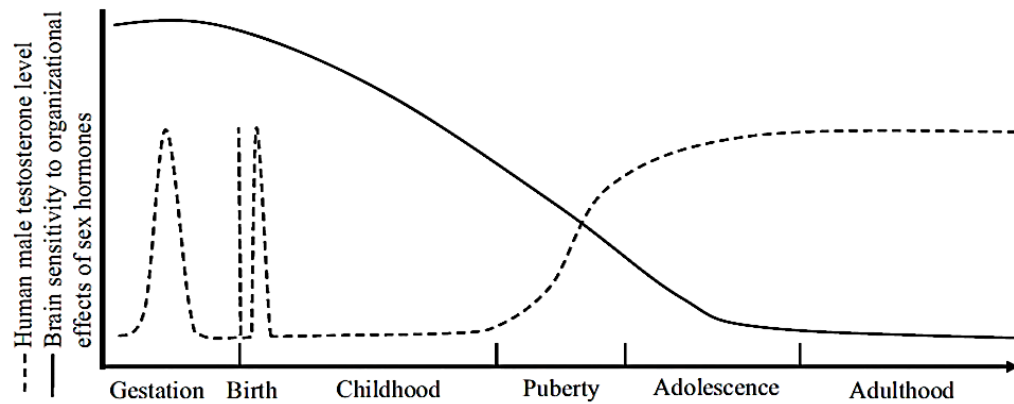


**Representación esquemática del metabolismo de Testosterona**

### Reprogramación Neonatal con Andrógenos y sus Efectos a Largo Plazo en el Cerebro.

Respecto a los efectos de los andrógenos durante las etapas del desarrollo, se ha observado que la máxima sensibilidad al efecto de estas hormonas es el periodo gestacional, la niñez y la pubertad [24] (ver figura 3). La razón de esta alta sensibilidad se debe a que el cerebro expresa Receptores de Andrógenos (AR) en diversas áreas cerebrales [25] que son capaces de regular la expresión de diversas proteínas y afectar la conducta [26].

**Figura 3:**



**Relación de niveles plasmáticos de Testosterona y sensibilidad cerebral a esta hormona. Esquema tomado de referencia [24].** Se puede observar que el periodo gestacional y neonatal manifiesta la mayor sensibilidad cerebral a hormonas sexuales. A lo largo de la infancia y en la adultez esta sensibilidad disminuye. Los niveles de testosterona en los primeros periodos del desarrollo coinciden con las ventanas de mayor sensibilidad a estas hormonas sexuales en el cerebro.

Considerando que la etapa neonatal es muy sensible a la acción de andrógenos, Sundblad y Eriksson (Universidad de Göttemburgo) [27] demostraron que la androgenización neonatal con T en ratas hembras produce la disminución a largo plazo de los niveles extracelulares de serotonina (5-HT) en la Amígdala. Mientras que a nivel conductual, la exposición neonatal a T produce una disminución de la memoria espacial y de neuronas TH positivas en Corteza PreFrontal (CPF), en un modelo animal de déficit atencional con hiperactividad [28].

Del punto de vista de la reprogramación, se ha visto que la exposición prenatal a glucocorticoides produce una disminución sérica de los niveles de T y un incremento del mRNA del AR en el Hipotálamo [29], mientras que a nivel del sistema dopaminérgico, la exposición prenatal a glucocorticoides produce una disminución del contenido de DA y un aumento del mRNA de receptores de DA (DAR) en Hipotálamo y NAcc [29]. Respecto, a la relación entre andrógenos y conductas adictivas, se ha establecido que un exceso de andrógenos, como T durante la adolescencia, podría tener un rol en el desarrollo y la mantención de la dependencia al alcohol [24].

Con todos estos antecedentes sobre los efectos de los andrógenos sobre la funcionalidad cerebral, en especial de la T en etapas tempranas del desarrollo, se ha planteado la siguiente hipótesis experimental.

## **HIPÓTESIS**

“La administración neonatal de TP en ratas hembras y machos produce un aumento del contenido y liberación de dopamina en neuronas dopaminérgicas Nigroestriatales y Mesolímbicas de la rata adulta”.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General:**

“Estudiar los efectos de la reprogramación neonatal con TP y DHT sobre el contenido de DA en SN-VTA y la liberación de DA en NAcc de ratas hembra y macho adultas”.

### **Objetivos Específicos:**

Para el desarrollo de este proyecto de tesis se pretende realizar los siguientes objetivos específicos según los siguientes protocolos (ver figura 4):

- ❖ Estudiar los efectos de la administración neonatal de TP (1.0 mg/50µL s.c.) en ratas hembras y machos durante las primeras 12 horas de vida sobre el contenido tisular de DA en SN-VTA y CE. Para cumplir este objetivo se utilizará un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detección electroquímica.
  
- ❖ Estudiar los efectos de la administración neonatal de DHT (1.0 mg/50µL s.c.) en ratas hembras y machos durante las primeras 12 horas de vida sobre el contenido tisular de DA en SN-VTA y CE. Para cumplir este objetivo se utilizará un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detección electroquímica.
  
- ❖ Estudiar los efectos de la administración neonatal de TP (1.0 mg/50µL s.c.) en ratas hembras y machos durante las primeras 12 horas de vida sobre la liberación de DA

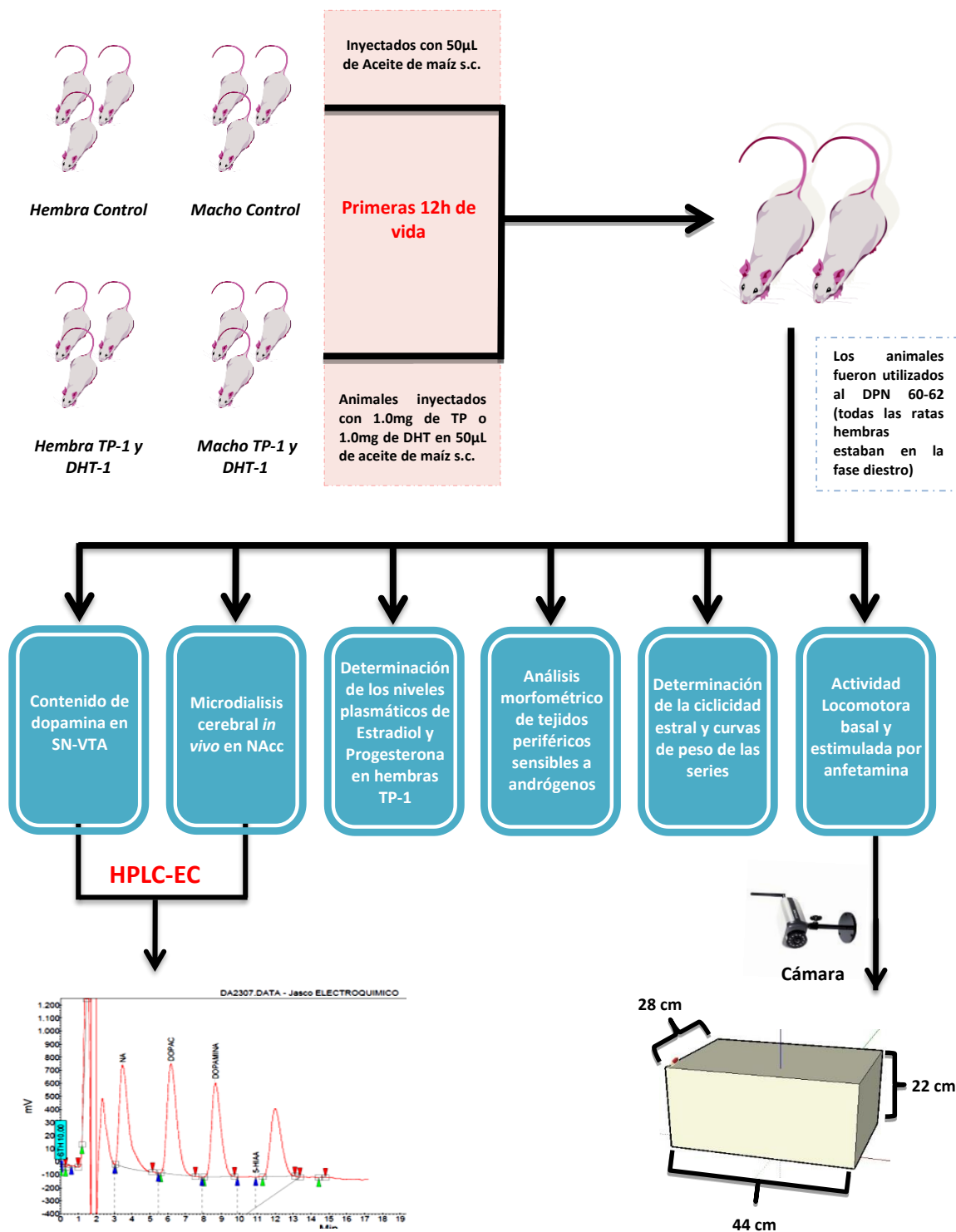
inducida por estímulo depolarizante ( $K^+$  70 mM) en NAcc. Para cumplir este objetivo se utilizará la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* y las muestras serán inyectadas en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detección electroquímica.

- ❖ Estudiar los efectos de la administración neonatal de DHT (1.0 mg/50 $\mu$ L s.c.) en ratas hembras y machos durante las primeras 12 horas de vida sobre la liberación de DA inducida por estímulo depolarizante ( $K^+$  70 mM) en NAcc. Para cumplir este objetivo se utilizará la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* y las muestras serán inyectadas en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detección electroquímica.
- ❖ Estudiar los efectos de la administración neonatal de TP (1.0 mg/50 $\mu$ L s.c.) en ratas hembras y machos durante las primeras 12 horas de vida sobre la liberación de DA en NAcc inducida por la administración de amfetamina intra-NAcc (10  $\mu$ M) o sistémica (1 mg/Kg i.p.). Para cumplir este objetivo se utilizará la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* y las muestras serán inyectadas en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detección electroquímica.
- ❖ Estudiar los efectos de la administración neonatal de DHT (1.0 mg/50 $\mu$ L s.c.) en ratas hembras y machos durante las primeras 12 horas de vida sobre la liberación

de DA en NAcc inducida por la administración de anfetamina intra-NAcc (10  $\mu$ M) o sistémica (1 mg/Kg i.p.). Para cumplir este objetivo se utilizará la técnica de microdiálisis cerebral *in vivo* y las muestras serán inyectadas en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detección electroquímica.

- ❖ Determinar los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona en hembras adultas tratadas al día postnatal (DPN) 60-62 con TP (1.0 mg/50 $\mu$ L s.c.) durante las primeras 12 horas de vida, a través de enzimo inmunoanálisis (EIA).
  
- ❖ Determinar parámetros morfométricos a DPN 60-62, como peso de gónadas, músculo tibial de ratas de ambos sexos tratadas con una dosis de TP o DHT (en ambos casos 1.0 mg/50 $\mu$ L s.c.) durante las primeras 12 horas de vida. Además, durante el periodo de crecimiento se determinará la ciclicidad estral de las hembras y control de peso de todos los animales.
  
- ❖ Determinar la actividad locomotora a DPN 60-62 de las ratas hembras y machos expuestas a TP o DHT (en ambos casos 1.0 mg/50 $\mu$ L s.c.) durante las primeras 12 horas de vida, a través del análisis de video grabaciones y el uso del software Any Maze.

Figura 4:



**Esquema del protocolo experimental de obtención y análisis de muestras para cada serie de animales (control y tratamiento). TP-1: Ratas tratadas con TP al DPN 1. DHT-1: Ratas tratadas con DHT al DPN 1.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Animales:**

Se utilizaron crías de rata Sprague Dawley recién nacidas. Todos los animales fueron alojados con sus respectivas nodrizas en el Bioterio de la Dirección de Investigación de la Universidad de Valparaíso. Desde la fecha del destete y hasta el DPN 60-62 los animales fueron alojados en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. Siempre los animales estuvieron en una sala de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad (55%) controlada, bajo ciclos luz-oscuridad (12:12 horas) con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética (CIBICA) y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, otorgados al Proyecto Fondecyt 111-21205 del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. Se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados en este proyecto y su sufrimiento.

### **Reactivos:**

Los estándares de TP, DHT, DA, NA, EDTA y ácido 1-octanosulfónico fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, Missouri, USA). La anfetamina sulfato fue donada por Laboratorios Chile S.A. (Ñuñoa, Chile) al Núcleo Milenio Estrés y Adicción de la P. Universidad Católica de Chile. Todos los otros reactivos utilizados en esta tesis son de grado analítico.

**Administración de TP y DHT:**

Las crías se dividieron aleatoriamente en grupos de animales control y tratamiento (TP-1 y DHT-1). Cada animal del grupo tratamiento TP-1 fue inyectado durante las primeras 12 horas de vida con una dosis de 1 mg de TP disueltos en 50  $\mu$ L de aceite de maíz (ver figura 4). Cada animal del grupo tratamiento DHT-1 fue inyectado durante las primeras 12 horas de vida con una dosis de 1 mg de DHT disueltos en 50  $\mu$ L de aceite de maíz (ver figura 4). Cada animal del grupo paralelo control fue inyectado durante las primeras 12 horas de vida con 50  $\mu$ L de aceite de maíz. La dosis de TP y DHT utilizadas fueron publicadas previamente [8,27,30]. Todas las crías fueron destetadas al DPN-21 y posteriormente alojadas en grupos de 6 animales en jaulas de tamaño estándar (44 cm de largo x 16 cm de altura x 23 cm de ancho) en la Sala de Mantenimiento de Animales de Experimentación del Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso. En las ratas hembras de cada grupo experimental se registraron los ciclos estrales a partir del DPN-40 hasta el final del estudio (DPN 60-62). El tiempo de apertura vaginal se registró en todos los grupos experimentales como un parámetro del inicio de la pubertad. El ciclo estral se determinó por el análisis microscópico de la proporción de leucocitos, células epiteliales y cornificadas en frotis vaginales diarios, cuya composición es característica de cada fase del ciclo [31]. Los animales fueron eutanasiados entre DPN 60-62 (las hembras en la fase diestro del ciclo estral) por decapitación y se recolectó sangre del tronco para determinar los niveles séricos de estradiol y progesterona en las ratas hembras.

### **Registro del Ciclo Estral:**

El registro diario del ciclo estral fue realizado a contar del DPN-40 y hasta la fecha de término de los experimentos. La fecha de apertura vaginal de los animales fue registrada y el ciclo estral fue caracterizado a través de los cambios citológicos que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroidales y que caracterizan las etapas periovulatorias [31]:

- Proestro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 12 a 24 horas y que citológicamente se caracteriza por presencia de células epiteliales nucleadas, bien redondeadas y solo algunas escamosas de forma irregular.
- Estro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 24 a 48 horas. Es el periodo de receptividad sexual por el macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células escamosas (con citoplasma granular), de forma irregular y agrupadas.
- Metaestro o Diestro 1: Duración de 12 a 24 horas. Presencia en el frotis de leucocitos y células escamosas.
- Diestro 2: Etapa del ciclo estral con una duración aproximada de 48 horas y con alta presencia en el frotis de leucocitos.

### **Enzimo Inmunoanálisis (EIA) para Hormonas Sexuales en Suero:**

Tras la decapitación de los animales al DPN 60-62, se recolectó la sangre del tronco de las ratas hembras para determinar los niveles séricos de progesterona y estradiol, los cuáles

fueron determinados por EIA, siguiendo las instrucciones del fabricante. El número de catálogo de los kits de ensayos que se utilizaron son 11-ESTH-430 para estradiol y 11-PROGH-305 para progesterona (Alpco Diagnostic, Windham, NH).

### **Extracción de Tejidos:**

Una vez que los animales fueron eutanasiados se extrajeron de las hembras sus ovarios, hipófisis y músculo tibial. Respecto a los ovarios, se consideró para el análisis estadístico el peso del ovario izquierdo de cada rata. En los machos se extrajeron los testículos, vesícula seminal, músculo tibial, e hipófisis. Todos estos tejidos fueron pesados en balanza analítica (Chyo, model JK-180, Japón) y sus pesos registrados para cada animal. En animales de todos los grupos de experimentación se extrajo el cerebro y se microdisectó a 4°C la Sustancia Nigra (SN), Área Tegmental Ventral (VTA) y Cuerpo Estriado (CE), según protocolos publicados previamente [32,33]. Las áreas cerebrales fueron almacenadas a -80°C hasta el momento del análisis.

### **Homogenización de Tejidos Cerebrales:**

Los tejidos microdisectados (SN-VTA y CE) se homogenizaron según el protocolo adaptado de Chi y cols. [34]. Brevemente, los tejidos se pesaron y homogenizaron en 400 µL de ácido perclórico (PCA) 0,2 N frío y mantenido en hielo en homogenizador vidrio-vidrio. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 13.000 *g* por 10 min a 4°C y el sobrenadante

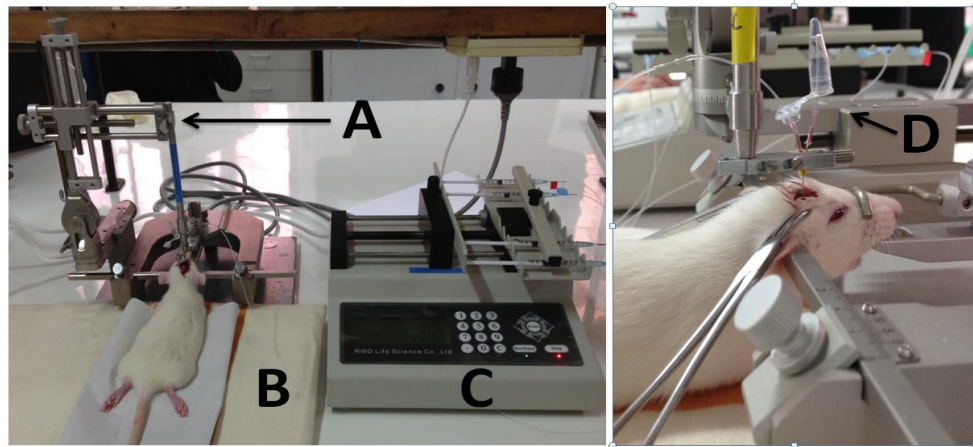
obtenido se separó y filtró a través de una unidad de filtración (0,2  $\mu\text{m}$  dispositivo de filtro, SM16534, Minisart NML, Sartorius) para ser usado en la determinación del contenido de DA en SN-VTA y CE. El pellet residual de cada muestra fue resuspendido en una solución de NaOH 1N para la cuantificación de proteína a través del ensayo Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA), usando albumina sérica bovina como estándar. El contenido de DA fue expresada como picogramos por miligramo de proteína total.

### **Microdiálisis Cerebral *in vivo*:**

#### **Preparación del Animal:**

Las ratas Sprague-Dawley al DPN 60-62 (en etapa diestro en el caso de las hembras) pertenecientes a los grupos control, TP y DHT fueron anestesiadas con una solución de Hidrato de Cloral (HC) al 4%  $\text{p/v}$ , a una dosis de 400 mg/Kg por vía intraperitoneal (i.p.). Una vez anestesiados, los animales se instalaron en un aparato estereotáxico (Modelo 68002, RWD Life Science Co. Ltd, China) (ver figura 5). La temperatura corporal de los animales fue monitoreada y se mantuvo entre 36-37°C con una manta eléctrica controlada por termostato. La mantención de la anestesia se logró administrando una dosis de  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{5}$  de la dosis inicial de HC, cada una hora durante todo el curso del experimento, chequeando constantemente la sedación del animal.

Figura 5:

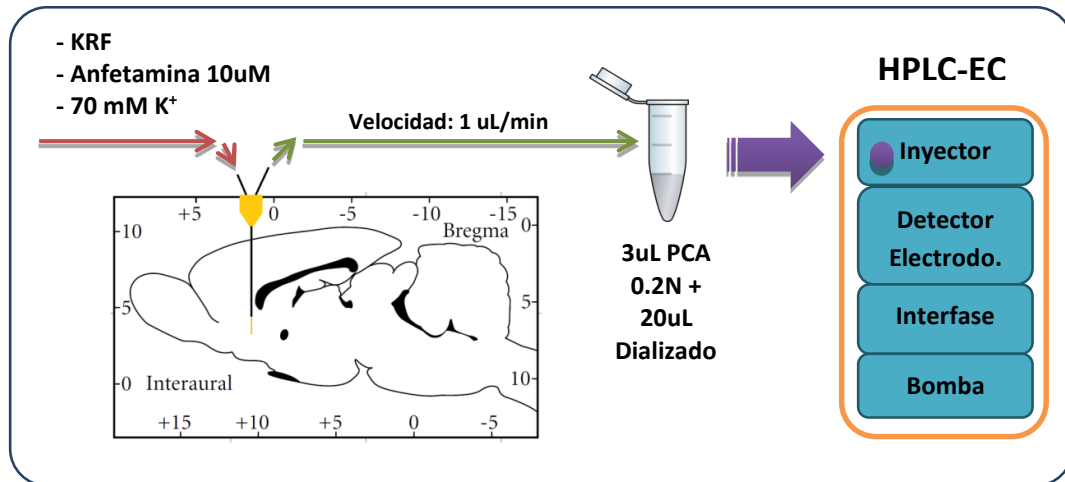


*Foto de microdiálisis cerebral in vivo en animal anestesiado. A: equipo estereotáxico; B: manta calefactora; C: bomba de microperfusión; D: recolección de muestra de dializado desde la cánula de microdiálisis implantada en NAcc.*

#### **Cirugía e Implantación de Cánula de Microdiálisis:**

Se expuso el cráneo de los animales a través de una incisión en la piel y un pequeño agujero fue taladrado sobre el área del NAcc usando las siguientes coordenadas de acuerdo al Atlas de Cerebro de Rata de Paxinos & Watson [35]: 1,4 mm anterior a bregma, 1,5 mm lateral y -7,8 mm ventral para el NAcc (ver figura 6). La cánula de microdiálisis (membrana de 2 mm; modelo CMA 11, 6.000 Dalton de Cut-Off, Solna, Suecia) fue implantada lentamente a una velocidad de 1 mm/min. Durante la implantación y a través de todo el experimento, la cánula de microdiálisis fue perfundida con solución tampón Krebs-Ringer-Fosfato (KRF) a una velocidad de 1  $\mu$ L/min por medio de una bomba de infusión RWD (Modelo RWD 210, RWD Life Science Co. Ltd, China). Después del periodo de estabilización de 90 min, se recolectaron muestras de dializado cerebral cada 20 min y según los protocolos especificados más adelante.

Figura 6:



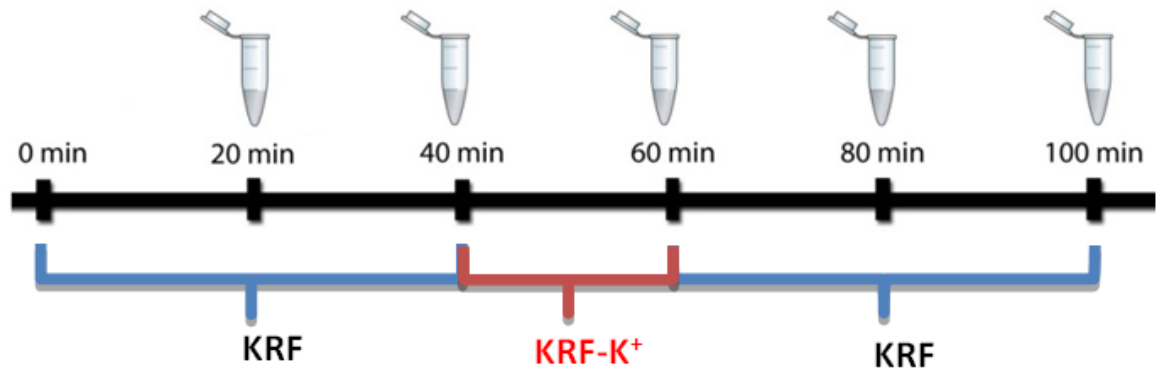
*Esquema representativo de la implantación de la cánula de microdialisis en NAcc. La flecha roja indica la solución perfundida (KRF, KRF + anfetamina o KRF + K<sup>+</sup>). La flecha gruesa púrpura indica la inyección directa de la muestra de dializado en el HPLC-EC.*

### Protocolos de Recolección de Muestras de Microdialisis.

Después del periodo de estabilización de 90 min, se recolectaron muestras de dializado cada 20 min y según los siguientes protocolos experimentales:

- Liberación de DA en NAcc por estímulo depolarizante: Una vez finalizado el periodo de estabilización se tomaron dos muestras basales de dializado entre los 0 y 40 minutos del periodo de recolección. Posteriormente, y por un tiempo correspondiente a una ventana de recolección (20 min), se perfundió intra-NAcc una solución de KRF con una concentración de K<sup>+</sup> 70 mM (40 y 60 minutos). Después de finalizada la perfusión con KRF-K<sup>+</sup> se volvió a perfundir una solución de KRF normal por otros 40 minutos, recolectando muestras de dializado a los 80 y 100 minutos del periodo de recolección (ver figura 7).

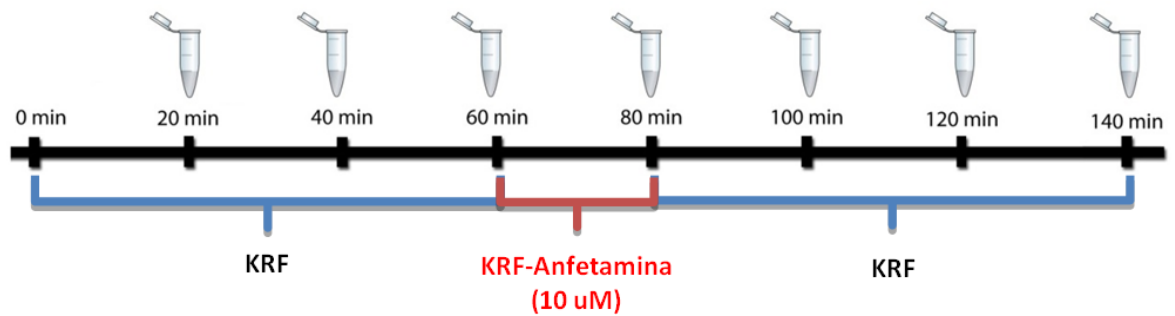
Figura 7:



*Esquema representativo de la perfusión y recolección de muestras de dializado en NAcc en el protocolo de perfusión de KRF-K<sup>+</sup> (70 mM) intra-NAcc. La recolección de cada una de las muestras se realizó en 3 µL de ácido perclórico 0,2 N. KRF: Krebs-Ringer-Fosfato normal.*

- Liberación de DA en NAcc por administración intra-NAcc de amfetamina: Una vez finalizado el periodo de estabilización se tomaron tres muestras basales de dializado entre los 0 y 60 minutos del periodo de recolección. Posteriormente y por un tiempo correspondiente a una ventana de recolección (20 min) se perfundió intra-NAcc una solución de KRF con una concentración de amfetamina 10 µM (60 y 80 minutos). Después de finalizada la perfusión con KRF-amfetamina se volvió a perfundir una solución de KRF normal por otros 60 minutos, recolectando muestras de dializado a los 100, 120 y 140 minutos del periodo de recolección (ver figura 8).

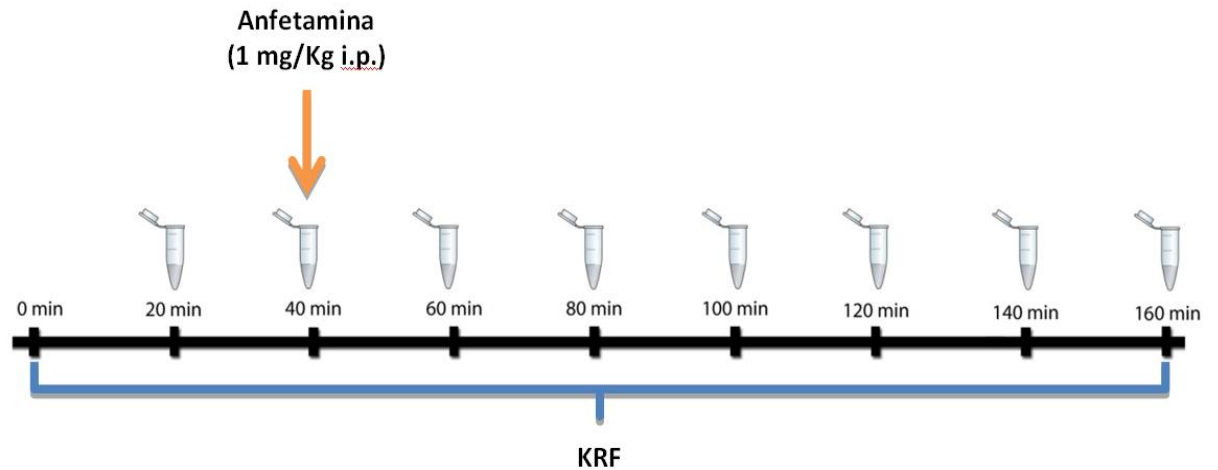
Figura 8:



*Esquema representativo de la perfusión y recolección de muestras de dializado en NAcc en el protocolo de perfusión de KRF-Anfetamina (10  $\mu$ M) intra-NAcc. La recolección de cada una de las muestras se realizó en 3  $\mu$ L de ácido perclórico 0,2 N. KRF: Krebs-Ringer-Fosfato normal.*

- Liberación de DA en NAcc por administración sistémica de anfetamina: Una vez finalizado el periodo de estabilización se tomaron dos muestras basales de dializado entre los 0 y 40 minutos del periodo de recolección. Posteriormente, al finalizar la recolección de la segunda muestra de dializado se inyectó por vía intra-peritoneal (i.p.) una dosis de anfetamina de 1 mg/Kg. El periodo de recolección de muestras de dializado posterior a la administración i.p. de anfetamina se extendió por 120 min, recolectando las muestras a los 60, 80, 100, 120, 140 y 160 minutos del periodo de recolección (ver figura 9).

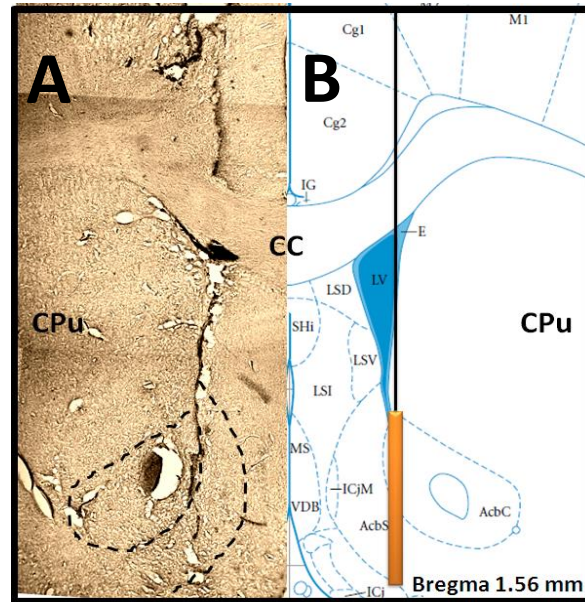
Figura 9:



*Esquema representativo de la perfusión y recolección de muestras de dializado en NAcc en el protocolo de perfusión de KRF e inyección sistémica de Anfetamina (1 mg/Kg i.p.). La recolección de cada una de las muestras se realizó en 3  $\mu$ L de ácido perclórico 0,2 N. KRF: Krebs-Ringer-Fosfato normal.*

Cada una de las muestras de dializado de los protocolos antes descritos fueron recolectadas sobre 3  $\mu$ L de PCA 0.2 N para preservar la integridad de las muestras y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el día de la cuantificación de la DA. Una vez finalizado cada uno de los experimentos, los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina y sus cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en p-formaldehído al 4%. Posteriormente, los cerebros fijados fueron cortados a un grosor de 50  $\mu$ m, teñidos con cresil violeta y se verificó la localización de la cánula de microdialisis mediante microscopía óptica (ver figura 10).

Figura 10:



*Figura compuesta de un corte coronal de cerebro de ratona formado por una microfotografía representativa de la postura de una cánula de microdialísis en NAcc (A) y por un esquema adaptado y tomado de la referencia [35] (B). En este esquema se aprecia la postura real y teórica de la membrana de la cánula de microdialísis, representada en (B) como un rectángulo de color naranja.*

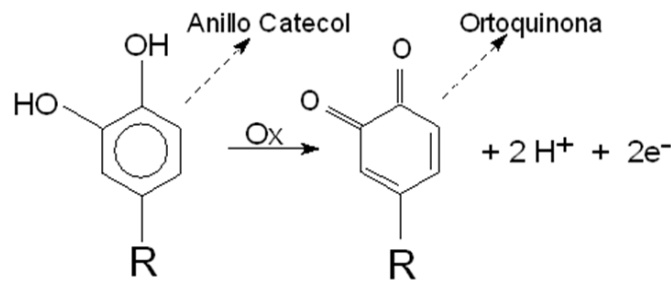
### Determinación de DA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Acoplada a

#### Detección Electroquímica:

Se inyectaron 10 $\mu$ L de cada solución filtrada (para medición de contenido) o de las muestras de dializado en un sistema de cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector electroquímico (HPLC-EC) con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan), 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 (ver figura 11). La fase móvil que se utilizó para la

determinación de DA fue bombeada a un flujo de 0,1 mL/min y tuvo la siguiente composición: 50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 mM de ácido 1-octanosulfónico, 0.27 mM de EDTA, 1,0% v/v de tetrahidrofurano y 3,5% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 2.8). Las áreas de los picos de DA en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de DA usando una curva de calibrado realizada en el programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokyo, Japan). Bajo estas condiciones el tiempo de retención de DA fue de 12 minutos, respectivamente.

**Figura 11:**



R =  $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$  = Dopamina (3-Hidroxitiramina, 3,4-dihidroxifeniletilamina)

R =  $-\text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$  = Noradrenalina (Norepinefrina)

*Esquema de la reacción de oxidación de catecolaminas que ocurre en el electrodo de trabajo del detector electroquímico. La oxidación de una molécula de catecolamina produce 2 electrones, esta corriente es directamente proporcional a la cantidad de moléculas de catecolaminas oxidadas.*

### Actividad Locomotora:

La actividad locomotora basal e inducida por anfetamina fue medida en los grupos control, TP-1 y DHT-1. Cada animal fue colocado en una jaula de ensayo (44 de largo x 22 de alto x 28 cm de ancho) y se registró la actividad locomotora basal durante los primeros

30 min. A los 30 minutos, cada animal se inyectó con una dosis de amfetamina (1 mg/Kg i.p. disuelto en solución salina fisiológica) y se registró su actividad locomotora durante 60 min. La actividad locomotora se registró por protocolo de Cámaras (IP) (Modelo LX-C202, Seguridad Lynx, China) fijas por encima de la jaula de ensayo y cada una conectada por internet a un ordenador en otra habitación. Los videos se analizaron con el sistema de seguimiento de vídeo ANY Maze (Stoelting Co., IL, USA) bajo licencia adquirida por el Dr. Alexies Dagnino-Subiabre. Las jaulas de ensayo fueron limpiadas y desinfectadas con una solución de etanol al 5% después de cada ensayo.

#### **Cálculos y Análisis Estadístico:**

Los resultados fueron expresados como valor promedio  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Las figuras que muestran un curso temporal de liberación de DA fueron analizadas por análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por un post-test Newman-Keuls. Las diferencias entre el grupo control y tratamiento fueron analizadas por test-t de Student's no-pareado y la diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de  $P$  fue menor que 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Además se utilizó ANOVA de dos vías para analizar las curvas temporales de actividad locomotora.

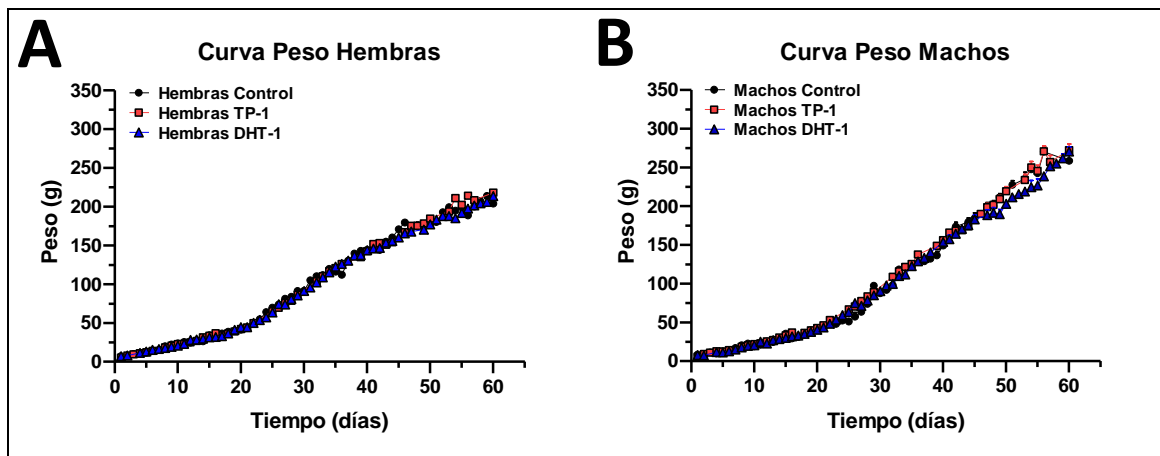
## RESULTADOS

### Caracterización del Modelo de Androgenización Neonatal

#### Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva:

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

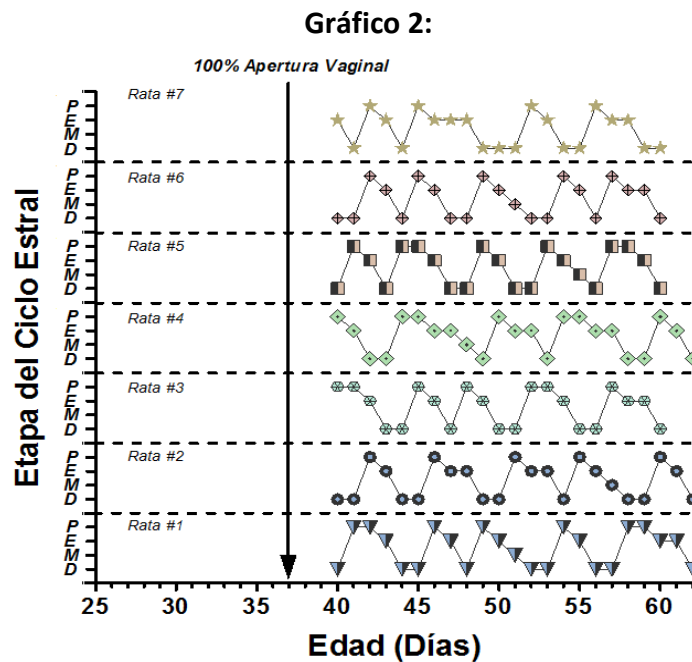
Gráfico 1:



Curvas representativas de ganancia de peso de series experimentales control, tratadas con TP al día 1 (TP-1) y tratadas con DHT-1. El panel (A) representa las curvas para ratas hembras y el panel (B) para ratas machos. (En (A) Control n= 19, TP n=16, DHT n=12 en (B) Control n=19, TP n=9, DHT n=10)

### Actividad Cíclica Estral:

A nivel reproductivo encontramos que la administración neonatal de TP o DHT produce a largo plazo en ratas hembras agénesis vaginal. Esto corresponde a una ausencia de apertura vaginal lo que impide registrar las etapas del ciclo estral por frotis vaginal. Las ratas hembras control que recibieron la administración de aceite de maíz mostraron una apertura vaginal del 100% al DPN-37. Además en el gráfico 2 se observa que la actividad cíclica estral desde el DPN-40 al DPN 60-62 fue normal con ciclos que duraron de 4 a 5 días.



*Gráfico representativo para 7 ratas hembras control las cuales recibieron la administración de aceite de maíz durante las primeras 12 horas de vida. La fecha indica el día de la apertura vaginal del 100 % del grupo de animales. P, proestro; E, estro; M, metaestro; D, diestro.*

### **Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Androgénicas:**

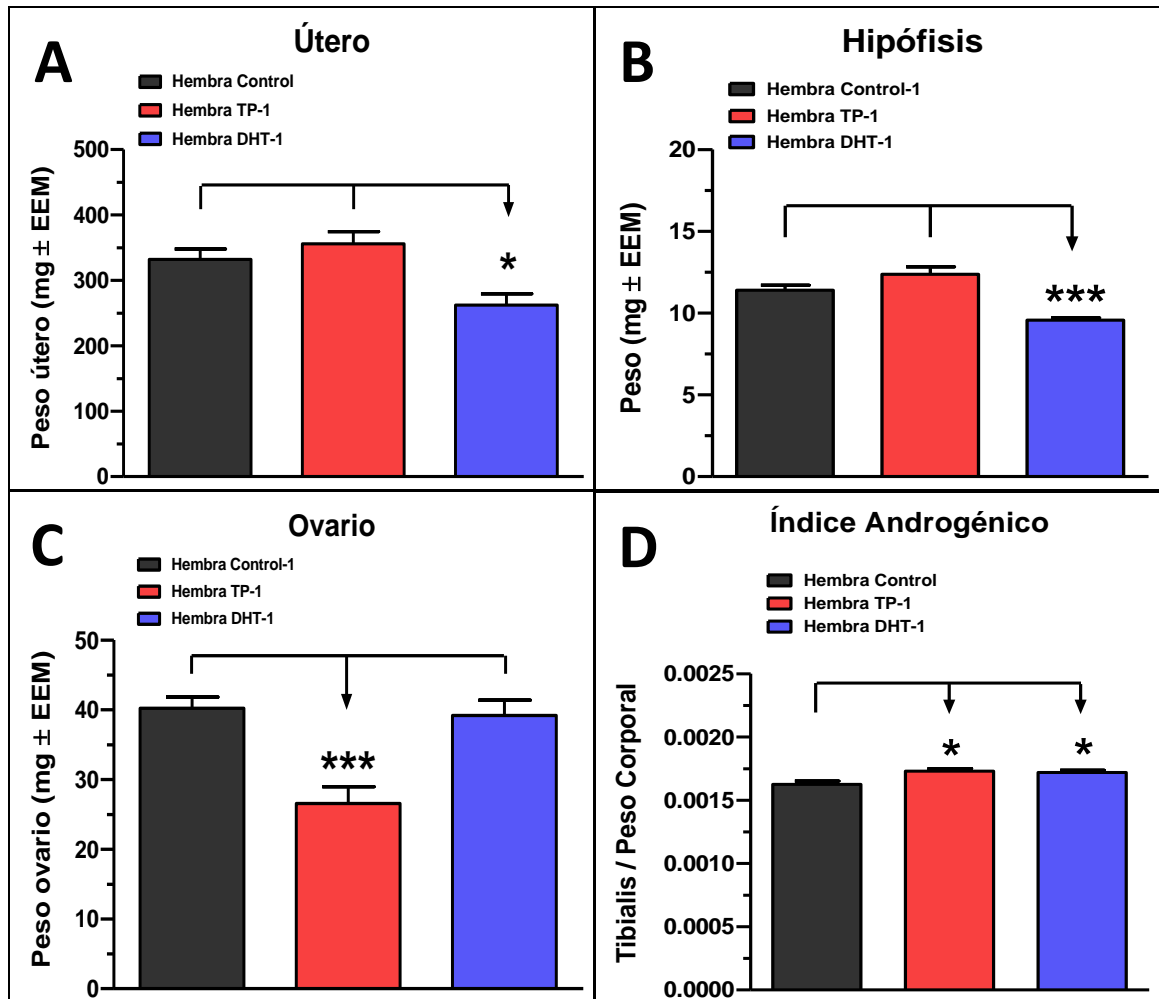
Los andrógenos tienen diversos tejidos blanco en el organismo, debido a que los AR se encuentran ampliamente distribuidos y afectan diversos órganos, es por eso que la exposición neonatal a andrógenos produce cambios en diversos tejidos diana como por ejemplo la hipófisis, útero, ovario además de cambios en la masa muscular producto de la actividad anabólica de estos.

Respecto a las hembras expuestas a andrógenos se observó una disminución significativa del peso del útero en ratas DHT-1 ( $262.10 \pm 17.33$  mg) versus ratas control ( $331.94 \pm 16.13$  mg) y ratas TP-1 ( $355.90 \pm 18.49$  mg) [ $F_{(2, 22)} = 5.455$ ;  $P=0.0119$ ] (ver gráfico 3, panel A). El peso de la hipófisis de ratas DHT-1 ( $9.57 \pm 0.14$  mg) fue significativamente menor que el peso de la hipófisis de ratas control ( $11.40 \pm 0.30$  mg) y ratas TP-1 ( $12.37 \pm 0.46$  mg) [ $F_{(2, 16)} = 18.09$ ;  $P<0.0001$ ] (ver gráfico 3, panel B). Respecto al peso del ovario izquierdo se observó una disminución significativa en ratas TP-1 ( $26.55 \pm 2.43$  mg) versus ratas control ( $40.23 \pm 1.61$  mg) y ratas DHT-1 ( $39.20 \pm 2.19$  mg) [ $F_{(2, 22)} = 12.41$ ;  $P=0.0002$ ] (ver gráfico 3, panel C).

En relación al índice androgénico (parámetro que relaciona el cociente entre el peso del músculo *tibialis* y el peso corporal de cada animal), que fisiológicamente representa el efecto anabólico de las hormonas androgénicas, observamos un incremento significativo de este índice al DPN-60 en las hembras expuestas a ambos andrógenos (TP:  $0.00173 \pm$

0.00002 y DHT:  $0.00172 \pm 0.00002$ ) comparado con las hembras control ( $0.00163 \pm 0.00002$ ) [ $F_{(2, 22)} = 5.118$ ;  $P = 0.0150$ ] (ver gráfico 3, panel D).

Gráfico 3:



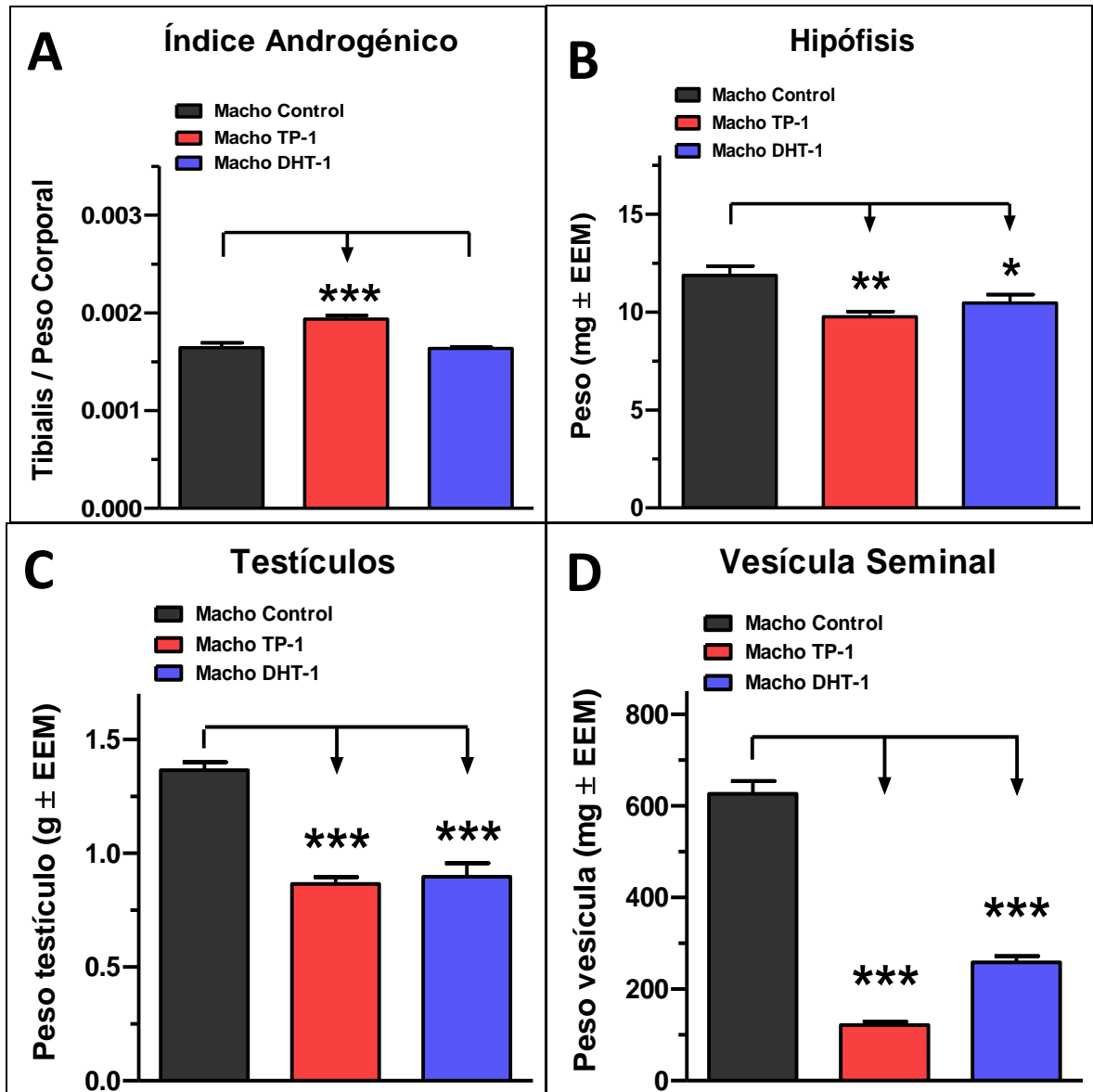
El gráfico muestra el tamaño del útero (A), hipófisis (B) y ovario (C) al DPN 60-62 de ratas hembras control y expuestas a andrógenos al DPN-1. En el panel (D) se representa el índice androgénico el cual corresponde al peso del músculo Tibialis dividido por el peso corporal de cada animal. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Útero: Control n=13, TP-1 y DHT-1 n=6. Hipófisis: Control n=7, TP y DHT n=6. Ovario: Control n=13, TP y DHT n=6. Índice androgénico: Control n=13, TP y DHT n=6). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ ).

En ratas machos inyectadas al DPN-1 con andrógenos se pudo observar una disminución estadísticamente significativa en el peso de los testículos de las ratas expuestas a TP y DHT (TP:  $0.8647 \pm 0.0295$  g; DHT:  $0.9063 \pm 0.0599$  g) con respecto a las ratas control ( $1.3647 \pm 0.0349$  g) [ $F_{(2, 25)} = 35.98$ ;  $P < 0.0001$ ] (ver gráfico 4, panel C). Con respecto a la vesícula seminal los resultados mostraron la misma tendencia, siendo los grupos expuestos a andrógenos (TP:  $121.37 \pm 7.64$ ; DHT:  $258.05 \pm 13.54$  mg) los que presentaron una disminución estadísticamente significativa en comparación a las ratas control ( $625.88 \pm 28.03$  g) [ $F_{(2, 14)} = 211.0$ ;  $P < 0.0001$ ] (ver gráfico 4, panel D).

En relación al peso de la hipófisis de los machos tratados con andrógenos (TP:  $9.77 \pm 0.26$  y DHT:  $10.47 \pm 0.43$ ) se observó una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo control ( $11.88 \pm 0.48$  mg) [ $F_{(2, 13)} = 6.825$ ;  $P = 0.0094$ ] (ver gráfico 4, panel B).

El índice androgénico (parámetro que relaciona el cociente entre el peso del músculo *tibialis* y el peso corporal de cada animal), el cual fisiológicamente representa el efecto anabólico de las hormonas androgénicas, observamos un incremento del peso estadísticamente significativo en ratas machos tratadas con TP ( $0.00194 \pm 0.00004$ ) respecto a ratas machos control ( $0.00165 \pm 0.00005$ ) y DHT ( $0.00164 \pm 0.00001$ ) [ $F_{(2, 16)} = 19.62$ ;  $P < 0.0001$ ] (ver gráfico 4, panel A).

Gráfico 4:

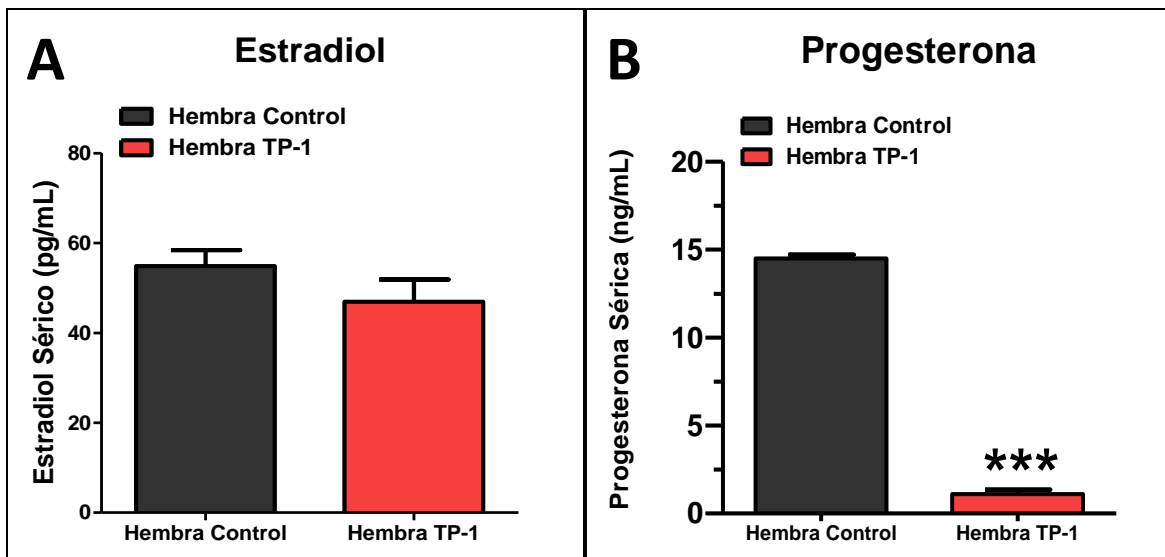


El panel (A) representa el índice androgénico al DPN-60 de ratas machos control versus ratas machos tratadas con TP y DHT al DPN-1. La administración neonatal de TP y DHT produce una disminución significativa del tamaño de la hipófisis (B), testículo (C) y vesícula seminal (D) al DPN-60 respecto a ratas control. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (índice androgénico: Control  $n=7$ , TP y DHT  $n=6$ . Hipófisis: Control  $n=4$ , TP-1 y DHT-1  $n=6$ . Testículos: Control  $n=14$ , TP  $n=4$ , DHT  $n=10$ . Vesícula seminal: Control  $n=6$ , TP  $n=7$ , DHT  $n=4$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.0001$ ).

### **Niveles Séricos de Progesterona y Estradiol en Hembras expuestas a TP**

La exposición neonatal a andrógenos además de sus efectos en órganos sensibles, también alteró las concentraciones séricas de hormonas esteroidales endógenas. La concentración sérica de Progesterona al DPN 60-62 disminuyó significativamente en ratas expuestas a la administración neonatal a TP ( $1.11 \pm 0.25$  ng/mL;  $P < 0.0001$ ), respecto a ratas hembras control ( $14.50 \pm 0.21$  ng/mL) (ver gráfico 5, panel B). Respecto a los niveles sérico de Estradiol al DPN 60-62 no se observó cambios estadísticamente significativamente en ratas expuestas a la administración neonatal a TP ( $46.96 \pm 4.93$  pg/mL;  $P = 0.1117$ ), respecto a ratas hembras control ( $54.86 \pm 3.57$  pg/mL) (ver gráfico 5, panel A).

Gráfico 5:



En el gráfico 5 panel (A) se representan los niveles séricos de estradiol (A) y progesterona (B) al DPN 60-62 de ratas hembras control versus ratas hembras tratadas con TP al DPN-1. En ambos gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (n=6 por grupo). El análisis estadístico se realizó utilizando un t-test para datos no pareados (\*\*\*)  $P < 0.0001$ .

### **Contenido de DA en SN-VTA y Cuerpo Estriado. Liberación de DA Basal y Estimulada por K<sup>+</sup> (70 mM) en NAcc. Estudios Neuroquímicos en Hembras**

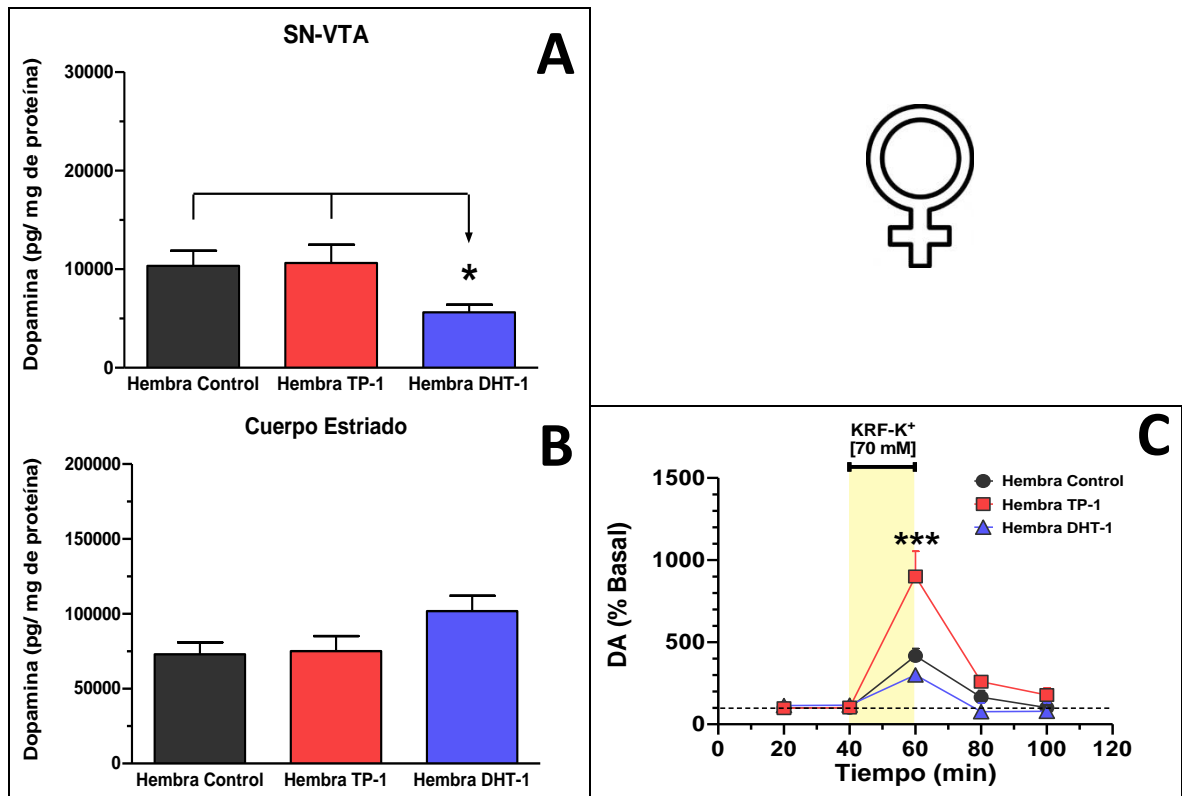
Con respecto al contenido de DA en hembras en la agrupación SN-VTA se observó una disminución estadísticamente significativa al DPN 60-62 en ratas tratadas durante las primeras 12 horas de vida con DHT ( $5617.67 \pm 771.10$  pg/mg de proteína) respecto ratas control ( $10331.33 \pm 1534.37$  pg/mg de proteína) y las ratas tratadas con TP ( $10629.00 \pm 1849.39$  pg/mg de proteína) [ $F_{(2, 14)} = 4.084$ ;  $P=0.0401$ ] (ver gráfico 6, panel A). Respecto al contenido de DA en CE al DPN 60-62 no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratas hembras control ( $72880.50 \pm 7971.51$  pg/mg de proteína), tratadas con TP ( $75033.50 \pm 10071.15$  pg/mg de proteína) y tratadas con DHT ( $101779.50 \pm 10204.42$  pg/mg de proteína) [ $F_{(2, 15)} = 2.889$ ;  $P=0.0868$ ] (ver gráfico 6, panel B).

Respecto a la liberación de DA en NAcc por un estímulo depolarizante de K<sup>+</sup> [70 mM] se observó en cada grupo experimental un aumento estadísticamente significativo en la liberación de DA a los 60 min debido al estímulo depolarizante, respecto a sus propios niveles basales (Hembra Control: [ $F_{(2, 15)} = 286.0$ ,  $P<0.0001$ ]; Hembra TP-1: [ $F_{(2, 9)} = 109.0$ ,  $P<0.0001$ ]; Hembra DHT-1: [ $F_{(2, 5)} = 155.0$ ,  $P<0.0001$ ]) (ver gráfico 6, panel C).

Respecto a la comparación entre los grupos experimentales sobre la liberación de DA estimulada por K<sup>+</sup> [70 mM] a los 60 min se observó un aumento estadísticamente significativo en el grupo de ratas hembras tratadas con TP al DPN-1 ( $900.2 \pm 153.3$  % de la liberación basal), respecto ratas hembras control ( $416.3 \pm 44.7$  % de la liberación basal) y a

ratas hembras tratadas con DHT al DPN-1 ( $300.3 \pm 4.8$  % de la liberación basal) ( $[F_{(2,9)}=40.34, P<0.0001]$ ) (ver gráfico 6, panel C).

Gráfico 6:



*Contenido de DA (pg/mg de proteína) en la agrupación SN-VTA (A) y en Cuerpo Estriado (B) al DPN 60-62 de ratas hembras control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. La liberación de DA basal y estimulada por  $K^+$  (70 mM) (C) fue medida a través de microdiálisis cerebral in vivo al DPN 60-62 de ratas hembras control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Microdiálisis: Control  $n=6$ , DHT  $n=4$ , TP  $n=4$ . Contenido de DA:  $n=6$  por grupo). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.0001$ ).*

### **Contenido de DA en SN-VTA y Cuerpo Estriado. Liberación de DA Basal y Estimulada por K<sup>+</sup> (70 mM) en NAcc. Estudios Neuroquímicos en Machos.**

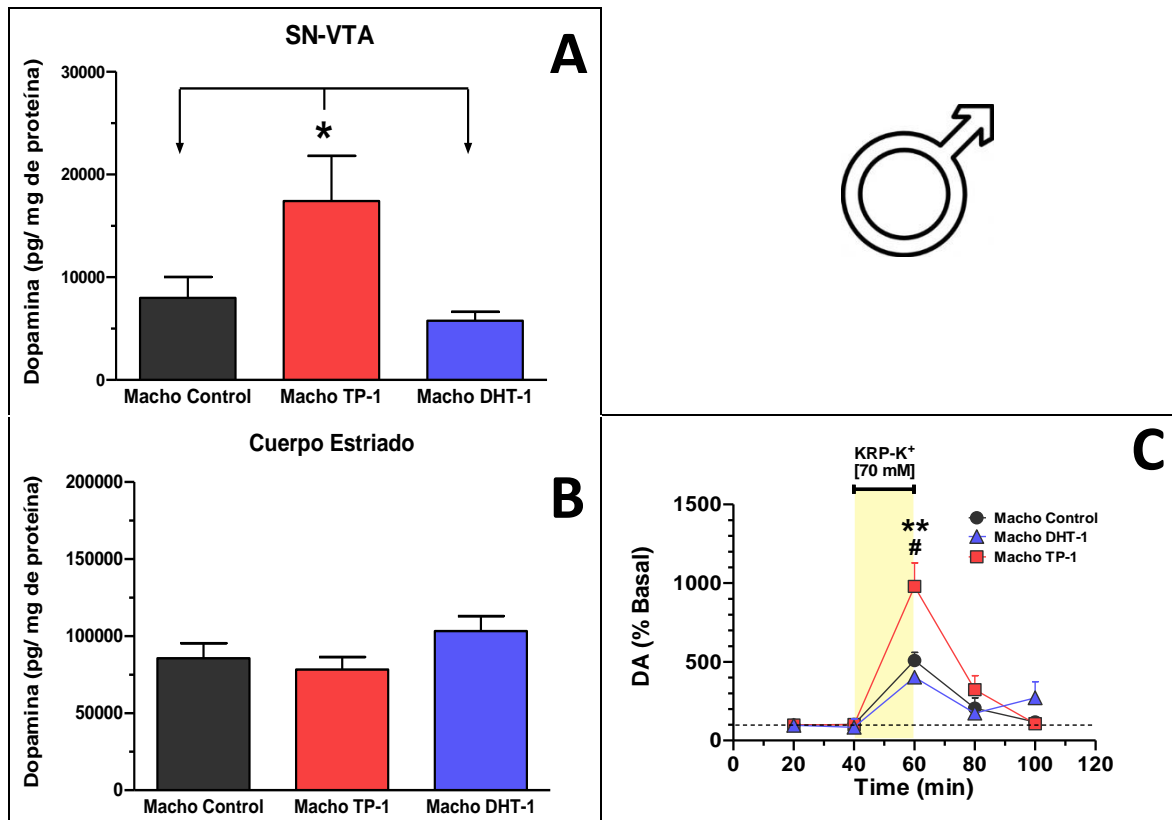
Con respecto al contenido de DA en machos en la agrupación SN-VTA se observó un aumento estadísticamente significativo al DPN-60 en ratas tratadas durante las primeras 12 horas de vida con TP ( $17407.50 \pm 4388.61$  pg/mg de proteína) respecto ratas machos control ( $7985.29 \pm 2029.61$  pg/mg de proteína) y las ratas machos tratadas con DHT ( $5765.83 \pm 858.81$  pg/mg de proteína) [ $F_{(2, 16)} = 4.802, P=0.0233$ ] (ver gráfico 7, panel A). Respecto al contenido de DA en CE al DPN-60 no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ratas machos control ( $85633.00 \pm 9786.38$  pg/mg de proteína), tratadas con TP ( $78322.16 \pm 8135.67$  pg/mg de proteína) y tratadas con DHT al DPN-1 ( $103276.20 \pm 9688.92$  pg/mg de proteína) [ $F_{(2, 12)} = 2.156, P=0.1585$ ] (ver gráfico 7, panel B).

Respecto a la liberación de DA en NAcc por un estímulo depolarizante de K<sup>+</sup> [70 mM] se observó en cada grupo experimental un aumento estadísticamente significativo en la liberación de DA a los 60 min por estímulo depolarizante respecto a sus propios niveles basales (Macho Control: [ $F_{(2, 15)} = 364.3, P<0.0001$ ]; Macho TP-1: [ $F_{(2, 9)} = 139.6, P <0.0001$ ]; Macho DHT-1: [ $F_{(2, 3)} = 67.43, P=0.0032$ ]) (ver gráfico 7, panel C).

Respecto a la comparación entre los grupos experimentales sobre la liberación de DA estimulada por K<sup>+</sup> [70 mM] a los 60 min se observó un aumento estadísticamente significativo en el grupo de ratas machos tratadas con TP al DPN-1 ( $979.0 \pm 148.6$  % de la

liberación basal), respecto ratas machos control ( $508.2 \pm 51.4$  % de la liberación basal) y a ratas machos tratadas con DHT al DPN-1 ( $401.9 \pm 4.6$  % de la liberación basal) ( $[F_{(2,9)}=8.840, P=0.0075]$ ) (ver gráfico 7, panel C).

Gráfico 7:



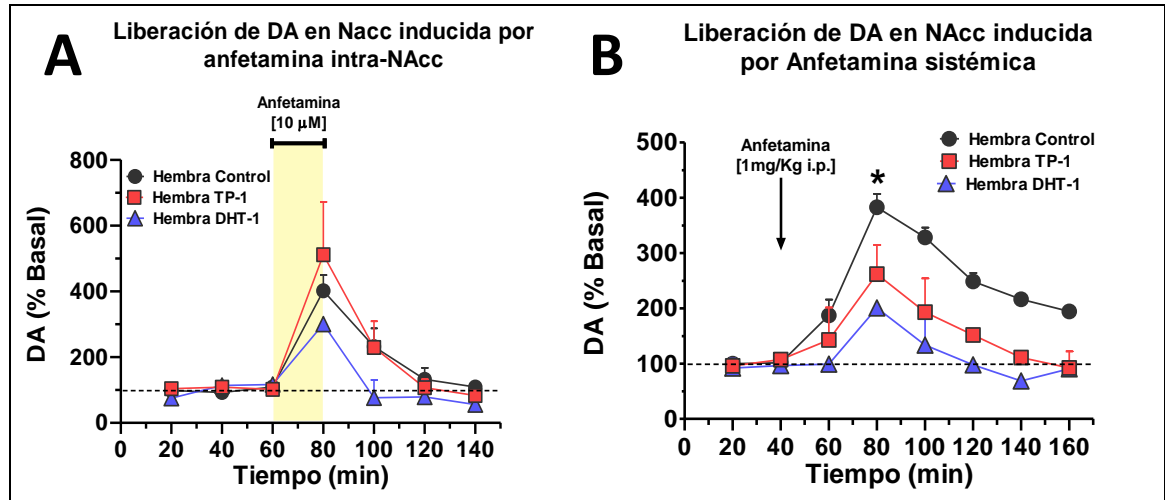
Contenido de DA (pg/mg de proteína) en la agrupación SN-VTA (A) y en Cuerpo Estriado (B) al DPN-60 de ratas machos control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. La liberación de DA basal y estimulada por  $K^+$  (70 mM) (C) fue medida a través de microdialísis cerebral in vivo al DPN-60 de ratas machos control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Microdialísis: Control n=6, TP n=4, DHT n=4. Contenido de DA: Control n=3, TP y DHT n=6). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\* $P<0.05$  (A y B), # $P<0.05$  (C) Control v/s TP-1, \*\* $P<0.01$  (C) TP-1 v/s DHT-1).

## **Liberación de DA en NAcc inducida por la Administración de Anfetamina Intra-NAcc y Sistémica al DPN-60 de Ratas Hembra Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos**

Con respecto a la liberación de DA en NAcc inducida por la administración de anfetamina intra-NAcc [10 $\mu$ M] se observó que para cada grupo experimental hubo un aumento estadísticamente significativo en la liberación de DA a los 80 min, respecto a sus propios niveles basales (Hembra Control: [ $F_{(3, 12)}= 37.85, P< 0.0001$ ]; Hembra TP-1: [ $F_{(3, 8)}= 6.40, P=0.0161$ ]; Hembra DHT-1: [ $F_{(3, 6)}= 32.97, P=0.0004$ ]) (ver gráfico 8, panel A). Respecto a la comparación de los valores de liberación de DA inducida por anfetamina a los 80 min no se observaron cambios estadísticamente significativos entre la liberación de ratas control ( $401.7 \pm 48.0$  % de la liberación basal), ratas TP-1 ( $511.4 \pm 160.6$  % de la liberación basal) y ratas DHT-1 ( $511.4 \pm 160.6$  % de la liberación basal) ( $[F_{(2, 6)}= 0.9030, P=0.4541]$ ) (ver gráfico 8, panel A).

La liberación de DA por la administración intraperitoneal de una dosis de anfetamina 1 mg/Kg al DPN 60-62 mostró una disminución estadísticamente significativa al minuto 80 entre las ratas expuestas a TP y DHT en comparación a las ratas hembras control, observando que la liberación máxima de DA (minuto 80) con respecto a sus basales fue un  $383.0 \pm 24.0\%$  para ratas hembras controles,  $200.7 \pm 2.2\%$  para tratadas con DHT y de un  $261.9 \pm 52.8\%$  para las ratas expuestas a TP ( $[F_{(2, 21)}= 5.077, P=0.0159]$ ) (ver gráfico 8, panel B).

Gráfico 8:



*Liberación de DA basal y estimulada por anfetamina (10 $\mu$ M) intra-NAcc (A). Liberación de DA basal y estimulada por una dosis de anfetamina sistémica (1mg/Kg i.p.) (B). Ambas fueron medidas a través de microdiálisis cerebral in vivo al DPN 60-62 de ratas hembras control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Microdiálisis: (A) Control n=4, DHT n=4, TP n=3, (B) Control n=6, TP y DHT n=4). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\*P<0.05).*

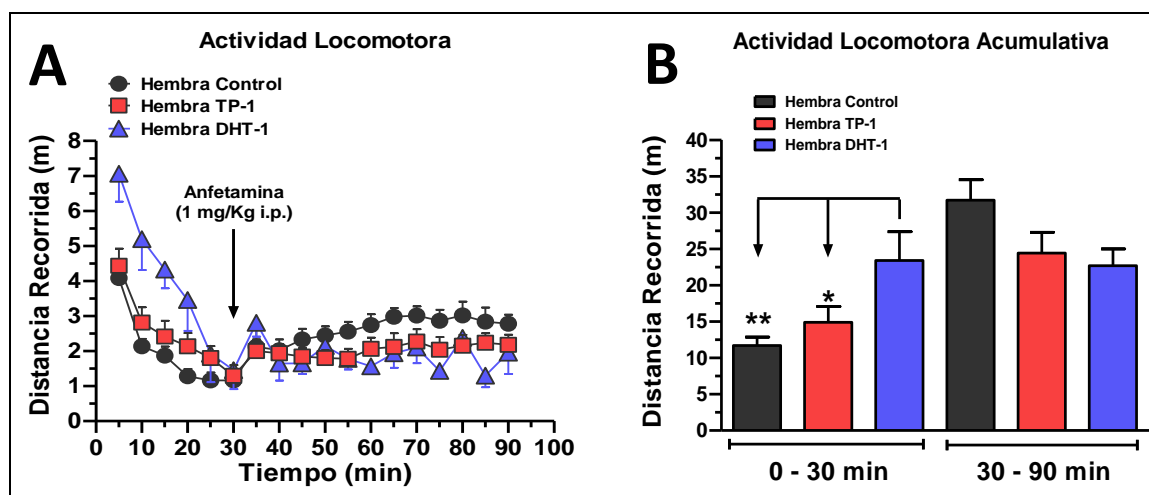
## **Actividad Locomotora inducida por la Administración de Anfetamina Sistémica al DPN-60 de Ratas Hembras Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos.**

En la actividad locomotora expresada cada 5 minutos (ver gráfico 9, panel A) no se observó una disminución significativa en la distancia recorrida inducida por anfetamina (1 mg/Kg i.p.) al comparar ratas hembras tratadas con TP al DPN-1 versus ratas control (Análisis estadístico por ANOVA de dos vías desde el minuto 35 al 90) (Tratamiento: [ $F_{(1, 288)} = 21.48$ ;  $P < 0.0001$ ]; Interacción: [ $F_{(11, 288)} = 0.3303$ ;  $P = 0.9787$ ]; Tiempo: [ $F_{(11, 288)} = 1.091$ ;  $P = 0.3685$ ]). Tampoco se observó un cambio estadísticamente significativo al comparar ratas hembras tratadas con DHT al DPN-1 versus ratas control (Tratamiento: [ $F_{(1, 192)} = 22.68$ ;  $P < 0.0001$ ]; Interacción: [ $F_{(11, 192)} = 1.151$ ;  $P = 0.3241$ ]; Tiempo: [ $F_{(11, 192)} = 0.8463$ ;  $P = 0.5941$ ]), ni al comparar ratas tratadas con TP al DPN-1 versus ratas DHT al DPN-1 (Tratamiento: [ $F_{(1, 216)} = 0.8899$ ;  $P = 0.3466$ ]; Interacción: [ $F_{(11, 216)} = 0.7379$ ;  $P = 0.7014$ ]; Tiempo: [ $F_{(11, 216)} = 0.7349$ ;  $P = 0.7043$ ]).

Al analizar la actividad locomotora acumulativa basal durante los primeros 30 minutos y que refleja la actividad locomotora basal (ver gráfico 9, panel B), observamos un incremento estadísticamente significativo en las ratas hembras tratadas con DHT al DPN-1 ( $23.42 \pm 3.94$  m) versus ratas hembras control ( $11.70 \pm 1.17$  m) y ratas hembras tratadas con TP al DPN-1 ( $14.90 \pm 2.18$  m) [ $F_{(2, 29)} = 5.302$ ;  $P = 0.0109$ ]. En relación a la actividad locomotora acumulativa inducida por anfetamina (desde los 30 a 90 minutos) no se observó diferencias estadísticamente significativas entre las hembras control ( $31.71 \pm 2.82$

m), hembras DHT ( $22.69 \pm 2.31$  m) y hembras TP ( $24.43 \pm 2.86$  m) [ $F_{(2, 29)} = 2.520$ ;  $P = 0.0980$ ] (ver gráfico 9, panel B).

Gráfico 9



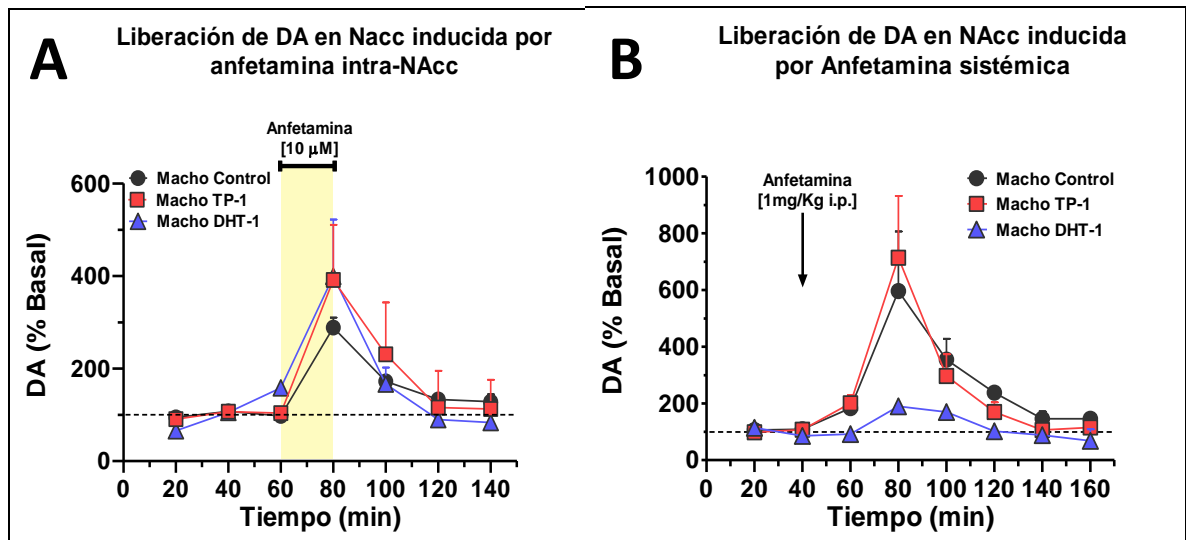
La actividad locomotora basal y estimulada (A) fue expresada cada 5 minutos y el análisis a través del software Any Maze al DPN 60-62 en ratas hembras control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. La actividad locomotora acumulativa basal y estimulada (B) fue medida a través del software Any Maze al DPN 60-62 en ratas hembras control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Actividad locomotora: Control  $n = 12$ , TP  $n = 14$ , DHT  $n = 6$ ). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

## **Liberación de DA en NAcc inducida por la Administración de Anfetamina Intra-NAcc y Sistémica al DPN-60 de Ratas Macho Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos**

Con respecto a la liberación de DA en NAcc inducida por la administración de anfetamina intra-NAcc [10 $\mu$ M] se observó para cada grupo experimental un aumento en la liberación de DA a los 80 min estadísticamente significativo respecto a sus propios niveles basales (Machos Control: [ $F_{(3, 8)} = 140.0, P < 0.0001$ ]; Machos TP-1: [ $F_{(3, 12)} = 23.53, P < 0.0001$ ]; Machos DHT-1: [ $F_{(3, 7)} = 14.73, P = 0.0021$ ]) (ver gráfico 10, panel A). Sin embargo, al comparar los valores de liberación de DA a los 80 min entre los grupos experimentales no se observaron cambios estadísticamente significativos en liberación de DA entre los grupos experimentales control ( $288.5 \pm 21.7$  % de la liberación basal), TP-1 ( $391.4 \pm 119.3$  % de la liberación basal) y DHT-1 ( $399.3 \pm 122.8$  % de la liberación basal) ([ $F_{(2, 7)} = 0.3160, P = 0.7390$ ]) (ver gráfico 10, panel A).

En cuanto a la liberación de DA inducida por la administración sistémica de anfetamina (1 mg/Kg i.p.) al DPN 60-62 no se observaron diferencias significativas a los 80 minutos entre las ratas machos control, TP y DHT al DPN-1 ([ $F_{(2, 22)} = 1.678, P = 0.2097$ ]) (ver gráfico 10, panel B).

Gráfico 10:



*Liberación de DA basal y estimulada por anfetamina (10 $\mu$ M) intra-NAcc (A). Liberación de DA basal y estimulada por una dosis de anfetamina sistémica (1mg/Kg i.p.) (B). Ambas fueron medidas a través de microdiálisis cerebral in vivo al DPN 60-62 de ratas macho control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Microdiálisis: (A) control, DHT y TP n=4, (B) control y TP n=4, DHT n=2). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\*\*P<0.0001).*

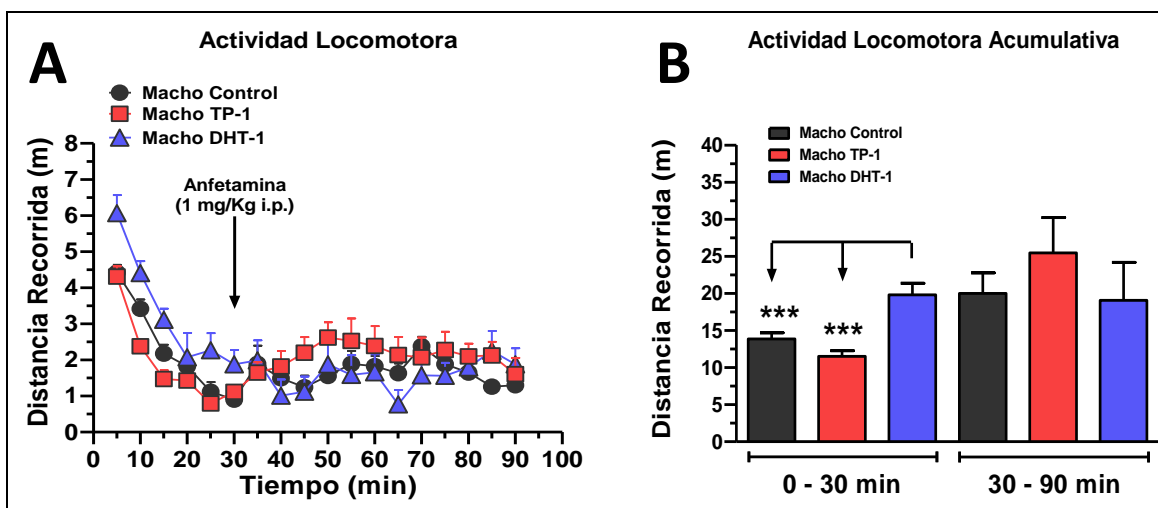
## **Actividad Locomotora inducida por la Administración de Anfetamina Sistémica al DPN-60 de Ratas Machos Control y Tratadas al DPN-1 con Andrógenos.**

En la actividad locomotora expresada cada 5 minutos (ver gráfico 11, panel A) no se observó una disminución significativa en la distancia recorrida inducida por anfetamina (1 mg/Kg i.p.) al comparar ratas machos tratadas con TP al DPN-1 versus ratas control (Análisis estadístico por ANOVA de dos vías desde el minuto 35 al 90) (Tratamiento: [ $F_{(1, 204)} = 7.697$ ;  $P = 0.0060$ ]; Interacción: [ $F_{(11, 204)} = 0.5347$ ;  $P = 0.8783$ ]; Tiempo: [ $F_{(11, 204)} = 0.7326$ ;  $P = 0.7075$ ]). Tampoco se observó un cambio estadísticamente significativo al comparar ratas machos tratadas con DHT al DPN-1 versus ratas control (Tratamiento: [ $F_{(1, 180)} = 0.2257$ ;  $P = 0.6353$ ]; Interacción: [ $F_{(11, 180)} = 0.9085$ ;  $P = 0.5334$ ]; Tiempo: [ $F_{(11, 180)} = 0.9065$ ;  $P = 0.5353$ ]), ni al comparar ratas machos tratadas con TP al DPN-1 versus ratas machos tratadas con DHT al DPN-1 (Tratamiento: [ $F_{(1, 192)} = 7.515$ ;  $P = 0.0067$ ]; Interacción: [ $F_{(11, 192)} = 0.6387$ ;  $P = 0.7942$ ]; Tiempo: [ $F_{(11, 192)} = 0.5951$ ;  $P = 0.8315$ ]).

Al analizar la actividad locomotora acumulativa durante los primeros 30 minutos y que refleja la actividad locomotora basal (ver gráfico 11 panel B), se observó un incremento estadísticamente significativo en las ratas machos tratadas con DHT al DPN-1 ( $19.80 \pm 1.57$  m) versus ratas machos control ( $13.86 \pm 0.83$  m) y a ratas machos tratadas con TP al DPN-1 ( $11.50 \pm 0.78$  m) [ $F_{(2, 24)} = 15.60$ ;  $P < 0.0001$ ]. Respecto a la actividad locomotora acumulativa desde los 30 a 90 minutos no se observó diferencias estadísticamente

significativas entre las ratas machos control ( $20.00 \pm 2.77$  m), machos DHT ( $19.06 \pm 5.13$  m) y machos TP ( $25.46 \pm 4.77$  m) [ $F_{(2, 24)} = 0.6551$ ;  $P = 0.5285$ ].

Gráfico 11:



*La actividad locomotora acumulativa basal y estimulada (B) fue medida a través del software Any Maze al DPN 60-62 en ratas macho control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. La actividad locomotora basal y estimulada (B) fue expresada cada 5 minutos y el análisis a través del software Any Maze al DPN 60-62 en ratas macho control y tratadas con andrógenos (TP y DHT) al DPN-1. En todos los gráficos se expresó el promedio  $\pm$  EEM (Actividad locomotora:  $n=9$  control,  $n= 10$  TP,  $n=8$  DHT.). El análisis estadístico se realizó utilizando un One Way Anova - Newman-Keuls post-hoc test (\*\*\*) $P < 0.0001$ .*

## **DISCUSIÓN**

### **1) Caracterización de la Androgenización Neonatal**

#### **1.1) Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de Andrógenos en Hembras:**

Dentro de los efectos producidos y descritos en esta tesis, se pudo observar que en las ratas expuestas a andrógenos durante las primeras horas de vida se produjo cambios significativos a largo plazo en tejidos sensibles a la acción hormonal, tanto en la periferia como a nivel del SNC. El objetivo de estudiar los efectos de andrógenos en tejidos sensibles, se basa en la expresión de AR y sirven como control positivo de los efectos a largo plazo que tiene la administración neonatal de andrógenos y que han sido descritos en la literatura previamente [6,8,30].

En las hembras expuestas a TP al DPN-1 encontramos una disminución significativa del tamaño del ovario izquierdo respecto al grupo control (gráfico 3, panel C). Este efecto ha sido evidenciado en la literatura como una reducción del tamaño del ovario que se produce por un aumento de quistes ováricos y una ausencia de cuerpos lúteos (CL) [8,30]. Esta ausencia de CL se relaciona directamente con la disminución significativa de los niveles séricos de progesterona que se observó en esta tesis (gráfico 5, panel B). Estos cambios han sido descritos en la literatura previamente y se debe a que la principal fuente de progesterona plasmática en la hembra proviene de los CL [30,36].

La actividad cíclica estral es un parámetro que permite evaluar la capacidad reproductiva de la hembra, ya que se puede observar en un intervalo de tiempo cuantos ciclos tiene una hembra y el número estimado de ovulaciones que esta ha tenido [37]. En los

resultados de esta tesis, sólo se observó actividad cíclica en ratas control (gráfico 2), ya que en las ratas hembras androgenizadas (TP y DHT) se produjo una agénesis vaginal, que impidió medir la etapa del ciclo estral. Esta agénesis vaginal ha sido descrita en la literatura como un efecto a largo plazo de la exposición neonatal a andrógenos [6,30]. Por lo cual este modelo experimental de androgenización neonatal ha demostrado cumplir con los parámetros antes descritos en la literatura.

Cabe señalar que en el Gráfico 3 (panel C) no se observaron cambios estadísticamente significativos en el peso del ovario en las ratas expuestas durante las primeras horas de vida a DHT. Este efecto puede deberse a que la DHT es un andrógeno no aromatizable, mientras que T se aromatiza en el ovario a estradiol (E2) [38,39]. En la literatura se ha descrito que la administración neonatal de EV produce una condición a largo plazo tipo ovario poliquístico que se caracteriza por ausencia de CL, formación de quistes ováricos, aciclicidad estral, disminución de la progesterona sérica y reducción del tamaño ovárico [6,30,37]. En este sentido, el efecto de la administración neonatal de TP observado en esta tesis y descrito anteriormente [6,8] puede estar mediado por una acción androgénica directa a través de su unión a AR ováricos o por un efecto estrogénico indirecto a través de la aromatización a E2 y su unión a receptores de estrógenos (ERs). Para evaluar si este efecto se asociaba a la aromatización a E2, fue clave realizar otras series experimentales que incluyeran la administración neonatal a DHT, la cual es una hormona androgénica no aromatizable [39]. En este sentido, se observó que en las ratas tratadas durante las primeras horas de vida con DHT, no hubo una disminución significativa del peso ovárico

comparado con animales tratados con TP. Esto indicaría que probablemente la reducción del tamaño de la gónada femenina esté mediado por la conversión aromática de T a E2 [38]. Cabe señalar que la aromatasas (CYP19A1) no sólo se expresa en tejidos reproductivos, como el ovario sino también en tejidos y órganos no reproductivos, como el tejido adiposo, el hígado y el cerebro [36,39].

En esta tesis se observó que en las hembras expuestas en las primeras horas de vida a andrógenos (TP y DHT) hubo una disminución estadísticamente significativa del peso de la hipófisis respecto al grupo control. Este efecto se puede explicar por la evidencia en la literatura que demuestra que la hipófisis de ovejas recién nacidas tienen a nivel de las células gonadotropas una proporción de AR y ERs similar [40]. Asumiendo una expresión neonatal similar de estos receptores en la hipófisis de rata, se podría suponer que la sensibilidad de esta glándula a andrógenos durante las primeras horas de vida puede afectar su desarrollo a largo plazo, favoreciendo una atrofia glandular. Funcionalmente, se ha demostrado en la literatura que la exposición prenatal a andrógenos afecta la migración celular de células productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) desde el área preóptica hipotalámica y por ende la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada [41].

### **1.2) Efectos en Órganos Sensibles a la Acción de Andrógenos en Machos:**

Uno de los efectos observado a largo plazo en ratas machos expuestas durante las primeras horas de vida a TP fue el incremento del índice androgénico. Este índice refleja los efectos anabólicos de los andrógenos, que fisiológicamente se relacionan con un

aumento de la captación de aminoácidos por la musculatura esquelética [36,39]. A nivel hipofisario, en machos tratados se observó una reducción significativa del tamaño de la hipófisis respecto a machos control. Esta glándula en la etapa neonatal expresa AR en las células gonadotropas [36,39], sin embargo la producción de los ligandos endógenos (T y DHT) no ocurre hasta la pubertad, en donde la T ejerce retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada [39], por lo que la administración neonatal de TP y DHT produce al igual que en las ratas hembras, una hipoplasia hipofisaria mediada por alteraciones del desarrollo neonatal de la glándula. Funcionalmente, se ha demostrado que la disminución del tamaño de la hipófisis se relaciona a una disminución de la producción de gonadotropinas plasmáticas, que llevaría a alteraciones a nivel de tejidos reproductivos [42]. En esta tesis se observó que la administración neonatal de TP y DHT produjo a largo plazo una reducción del tamaño de los testículos (gráfico 4, panel C) y de la vesícula seminal (gráfico 4, panel D). Funcionalmente, esta reducción del tamaño testicular ha sido descrita en la literatura y se asocia a una disminución a largo plazo de los niveles plasmáticos de T [43]. Sin embargo, esta disminución en los niveles plasmáticos de T no se debe a una menor síntesis esteroidogénica, sino a una mayor aromatización a E2 [43]. En este mismo trabajo se demostró que la administración neonatal a TP incrementaría la expresión testicular de la aromatasa en ratas machos adultas [43]. Sin embargo, la expresión cerebral de la aromatasa en áreas relacionadas con conductas motivadas y locomoción no ha sido estudiada.

## **2) Efectos de la Administración Neonatal a Andrógenos en Áreas Cerebrales relacionadas con Motivación y Locomoción.**

### **2.1) Efectos en el Contenido de DA en SN-VTA y CE de Ratas Hembras Androgenizadas:**

Dentro de las áreas dopaminérgicas cerebrales, el circuito mesocorticolímbico ha sido asociado con los efectos recompensantes de las drogas de abuso a través de la activación de neuronas dopaminérgicas del VTA que liberan DA en NAcc [11]. Por otro lado, el circuito nigroestriatal está conformado por neuronas dopaminérgicas de la SN que liberan DA en CE y son responsables principalmente de la locomoción [15]. Las neuronas dopaminérgicas de ambos circuitos expresan la enzima TH responsable de la síntesis de DA. Además, se ha descrito que tanto a nivel de los somas (SN-VTA) y de los terminales neuronales (CE-NAcc) se expresan receptores para hormonas sexuales (ERs y AR) [44], tanto en la adultez como también en etapas neonatales [45].

Existe evidencia en la literatura sobre los efectos moduladores de las hormonas sexuales en neuronas dopaminérgicas [46,47]. Por ejemplo, se ha demostrado que el E2 tendría un efecto modulador positivo que favorece la expresión de TH en SN-VTA de ratas hembras adultas [48]. Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio, han demostrado que la administración neonatal de estradiol valerato (EV) produce un aumento del contenido de DA y NA en SN-VTA de ratas hembras adultas [49].

Respecto a los efectos de los andrógenos sobre neuronas dopaminérgicas, se demostró que estas hormonas actúan como moduladores negativos de la expresión de la TH en SN-VTA de ratas machos adultas [50]. Los resultados de esta tesis, están de acuerdo con estos

antecedentes, ya que el contenido de DA en SN-VTA de ratas hembras tratadas con DHT es significativamente menor respecto a ratas control (gráfico 6, panel A). Una explicación para este efecto podría estar relacionada con la modulación negativa de la actividad transcripcional del gen de la TH por andrógenos. Cabe destacar, que en otra tesis de grado de nuestro laboratorio están siendo realizados experimentos para dilucidar el efecto de andrógenos sobre la expresión del mRNA de la TH. Sin embargo, la administración neonatal de TP no produjo cambios significativo en el contenido de DA en SN-VTA respecto a ratas hembras control (gráfico 6, panel A). Esta ausencia de efecto podría explicarse en parte por una posible aromatización de TP a E2, ya que como se mencionó previamente la administración neonatal de EV produce un aumento en el contenido de DA en SN-VTA de ratas hembras adultas [49]. Esta posible aromatización aumentaría los niveles de DA en SN-VTA al nivel de una rata hembra control, mientras que el efecto neto de la administración neonatal de un andrógeno no aromatizable (DHT) produce una disminución significativa del contenido de DA (gráfico 6, panel A).

## **2.2) Efectos en el Contenido de DA en SN-VTA y CE de Ratas Machos Androgenizadas:**

En ratas machos tratadas con TP al DPN-1 se observó un aumento del contenido de DA en SN-VTA al DPN-60 (gráfico 7, panel A), mientras que la administración neonatal de DHT no produjo cambios significativos en el contenido de DA en SN-VTA al DPN-60 respecto a ratas machos control. Este resultado es muy interesante, ya que nos muestra que la administración neonatal de TP podría en parte ejercer su efecto a través de una aromatización de T a E2. Se ha descrito en la literatura (utilizando un modelo similar al de

esta tesis) que la aromatización periférica de T a E2 aumenta significativamente en ratas machos adultas (DPN 80) expuestas durante las primeras horas de vida TP [43]. Este incremento en la aromatización, favorecería un efecto estrogénico a nivel cerebral que podría aumentar el contenido de DA a nivel de SN-VTA observado en esta tesis (gráfico 7, panel A).

Por otro lado, se ha demostrado que en etapas perinatales, la expresión y actividad de aromatasa a nivel cerebral está aumentada, específicamente al DPN 2 se ha descrito que en el hipotálamo de ratas machos su expresión es casi 4 veces mayor que en hembras a la misma edad neonatal [51], mientras que en mesencéfalo la mayor expresión de aromatasa se ha establecido entre el DPN-2 y DPN-15 [51]. Estos antecedentes nos permitirían inferir que la acción de la TP en áreas como SN-VTA podría estar mediada por su aromatización a E2 durante los primeros días de vida postnatal, ya que se ha demostrado que la administración neonatal de EV aumenta el contenido de DA en SN-VTA [49]. En este sentido, el efecto de E2 sobre la TH aumentaría los niveles de expresión del mRNA de TH y por consecuencia los niveles de la proteína en neuronas dopaminérgicas, a través de un efecto inicial sobre la transcripción del gen de la TH (el cual posee sitios de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en su promotor) [52,53]. Actualmente en nuestro laboratorio se está realizando una tesis destinada a ver los efectos de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles del mRNA de TH y la proteína en SN-VTA de ratas al DPN-60.

### **2.3) Efectos de la Administración Neonatal de Andrógenos Sobre la Liberación de DA en NAcc de Ratas Hembras Adultas:**

En las ratas hembras tratadas con andrógenos al DPN-1 (TP y DHT) no se encontró diferencias significativas en la liberación de DA mediada por anfetamina (10  $\mu$ M) intra-Nacc (gráfico 8, panel A), sin embargo la liberación provocada por un estímulo depolarizante ( $K^+$  70 mM) aumentó significativamente la liberación de DA en NAcc en las ratas hembras tratadas con TP al DPN-60 (gráfico 6, panel C). Respecto a esta mayor liberación, es posible que el tratamiento neonatal con andrógenos produzca cambios en proteínas involucradas en la exocitosis que favorezcan la depolarización del terminal dopaminérgico; por ejemplo, se puede esperar un aumento de la expresión de canales de  $Ca^{+2}$  sensible a voltaje, sin embargo es necesario realizar futuros experimentos para demostrar este efecto.

Respecto a la liberación de DA en NAcc inducida por la perfusión intra-NAcc de anfetamina en ratas hembras adultas tratadas al DPN-1 con TP y DHT, no observamos cambios significativos (gráfico 8, panel A). Estos resultados permiten suponer que no habría cambios significativos en la expresión del DAT en los terminales dopaminérgicos del NAcc en ratas hembras adultas androgenizadas. La razón de esta suposición se debe a que DAT es el blanco farmacológico de la anfetamina y su reversión favorece la liberación de la DA almacenada en vesículas [14,54]. Sin embargo, ha sido demostrado que el DAT es regulado por estrógenos, ya que estudios *in vitro* demuestran que E2 reduce la expresión de DAT en cultivo embrionario de células mesencefálicas [55].

La liberación de DA estimulada por una dosis de anfetamina sistémica (1 mg/Kg i.p.) en las ratas hembras androgenizadas (TP y DHT) fue estadísticamente menor a los 80 minutos en NAcc que la observada en ratas hembras controles (gráfico 8, panel B). Este efecto podría explicarse por una menor biodisponibilidad de la anfetamina, ya sea por una mayor metabolización de primer paso o por una mayor inducción citocromal favorecida por la exposición neonatal a andrógenos.

#### **2.4) Efectos de la Administración Neonatal de Andrógenos Sobre la Liberación de DA en NAcc de Ratas Machos Adultas:**

En los machos expuestos a TP al DPN-1 se pudo observar un aumento estadísticamente significativo en la liberación de DA inducida por un estímulo depolarizante de  $K^+$  (gráfico 7, panel C), esta mayor liberación de DA podría estar correlacionada con el mayor contenido de DA en SN-VTA observado previamente (gráfico 7, panel A), ya que el aumento de la cantidad de DA disponible en las vesículas sinápticas estará disponible para liberación frente a la llegada de un potencial de acción.

Respecto a la liberación de DA inducida por un estímulo depolarizante de  $K^+$  en ratas machos tratadas con DHT al DPN-1 fue similar a la observada en ratas machos controles al DPN-60 (gráfico 7, panel C). Estos resultados demuestran que la administración neonatal de DHT no afecta la maquinaria de liberación de DA en NAcc.

En los machos androgenizados con TP y DHT no se observaron cambios significativos en la liberación de DA en NAcc inducida por la administración intra-NAcc y sistémica de anfetamina al DPN-60 (gráfico 10, panel A y B, respectivamente). Estos resultados indicarían que el efecto de la administración neonatal de andrógenos sobre liberación de DA no afectaría la expresión del DAT en la rata, ya que esta proteína es blanco molecular de acción de la anfetamina. Sin embargo, en la literatura se ha descrito que T y DHT afectan la síntesis y liberación de DA a través de la modificación de proteínas dopaminérgicas. Por ejemplo, en ratas machos adolescentes castradas se observó que la administración de TP o DHT modifica la expresión de mRNA de DAT, VMAT<sub>2</sub> y TH [56]. Es preciso señalar que las diferencias de los protocolos experimentales pueden llevar a resultados diametralmente opuestos. Por ejemplo nuestro protocolo de administración neonatal es muy diferente al establecido por Purves-Tyson et al., ya que en ese trabajo se gonadectomizaron los machos al DPN-45, administrándose T y DHT durante 2 semanas [56]. En este sentido, nuestro protocolo experimental afecta ventanas del desarrollo neonatal temprano y varios sistemas pueden verse afectados. En el caso de la administración neonatal de andrógenos en ratas machos, nuestro protocolo parece afectar la expresión de TH, sin modificar la del DAT.

En el caso de la administración neonatal de DHT al DPN-1 (gráfico 10, panel B) se puede observar que la magnitud de la liberación de DA en NAcc inducida por la administración sistémica de anfetamina, fue mucho menor que en los otros dos grupos experimentales (TP y Control). Algunas de las explicaciones que pueden dar cuenta de este efecto están

relacionadas con problemas metodológicos: **a)** Una razón por la cual no se apreció diferencias significativas en la liberación de DA inducida por anfetamina en ratas DHT, puede deberse a la baja recuperación para DA que tuvieron las cánulas de microdiálisis. Este punto es crítico, ya que el % de recuperación influye de manera directamente proporcional en la detección electroquímica de DA. **b)** Al reducido número de animales tratados con DHT para este protocolo experimental (n=2). La razón de este disminuido número de animales ha sido asociada a problemas de reproducción a nivel del Bioterio de nuestra Universidad.

## **2.5) Efectos de la Administración Neonatal de Andrógenos Sobre la Actividad Locomotora de Ratas Adultas:**

Respecto a la actividad locomotora basal (0-30 min) y estimulada por anfetamina (30-90 min), esta fue expresada como distancia recorrida (m) cada 5 minutos. En este sentido, no se observaron cambios estadísticamente significativos entre las curvas de los grupos de animales tratados con andrógenos (TP y DHT) en el periodo neonatal versus los grupos control. Cabe señalar que tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los sexos en las condiciones experimentales TP, DHT y Control (gráfico 9 y 11, panel A). Con respecto a la actividad locomotora acumulativa basal se encontró diferencias significativas entre las ratas machos y hembras expuestas a DHT versus las ratas control y TP, lo cual podría deberse al rol de los andrógenos como moduladores de conductas tipo ansiosas [57]. Una exposición a andrógenos en el periodo neonatal podría

modificar la distribución de AR en el cerebro [58] y de esta manera afectar la conducta a largo plazo en las ratas DHT. Esto llevaría a una conducta tipo ansiosa que se ve reflejada en un incremento en la actividad locomotora basal acumulativa. En la literatura, se ha demostrado que utilizando un modelo animal de trastorno de déficit de atención (TDAH) con hiperactividad, la administración de T al DPN-10 produce conductas tipo TDAH, como hiperactividad, impulsividad y alteraciones cognitivas [28]. Sin embargo, para poder caracterizar estas conductas en nuestras ratas tratadas al DPN-1 con DHT es necesario realizar más estudios y utilizar otros test conductuales que permitan medir estas conductas. Respecto a la actividad locomotora acumulativa estimulada por anfetamina no se observó diferencias significativas entre los grupos experimentales ni entre sexos (gráfico 9 y 11, panel B). Sin embargo, en las hembras tratadas con TP y DHT hay una leve tendencia a la disminución de la actividad locomotora acumulativa inducida por anfetamina (gráfico 9, panel B). Este resultado es interesante y abre nuevas perspectivas al modelo utilizado, ya que si el tratamiento neonatal con andrógenos produce conductas relacionadas con TDAH se podría relacionar esta tendencia a la disminución en la actividad locomotora inducida por anfetamina observado en esta tesis, con el posible efecto terapéutico de anfetamina en el TDAH. Actualmente, en el tratamiento del TDAH se utilizan medicamentos que son análogos estructurales de la anfetamina, como la d-anfetamina, lisdexanfetamina (sustratos del DAT) o el metilfenidato (bloqueador del DAT)[59].

### **3) Cambios Epigenéticos y Proyecciones a Futuro.**

#### **3.1) Efectos Epigenéticos a Largo Plazo Mediado por Hormonas Sexuales:**

En esta tesis de grado se observó que los efectos producidos por las hormonas sexuales en ventanas críticas del desarrollo se mantienen a largo plazo. En este sentido, las alteraciones producidas en un periodo de alta sensibilidad cerebral como la etapa perinatal, pueden tener consecuencias en la adultez. Estas alteraciones comprenden cambios en la expresión de distintos genes y proteínas, a través de mecanismos que corresponden a modificaciones de los patrones de metilación en promotores de genes específicos. Por ejemplo, dentro de los efectos epigenéticos a largo plazo descritos en la literatura, se ha observado que el E2 puede regular a sus propios ERs en periodos neonatales, modificando los patrones de metilación en islas CpG del promotor de ER $\alpha$  [60]. También se ha demostrado que un aumento en la metilación en sitios CpG en el promotor del gen para ER $\alpha$ , se relaciona con una disminución de su mRNA en el Área Preóptica (POA) al DPN-8, luego de la administración de E2 benzoato al DPN 1-2 [61]. Sin embargo, cada zona cerebral presenta una sensibilidad distinta a las hormonas sexuales, por lo cual nuestro protocolo de administración neonatal de andrógenos podría alterar la proporción de expresión ER $\alpha$ /ER $\beta$  en SN-VTA o tener un efecto directo sobre la expresión del AR que modificarían proteínas esenciales para la neurotransmisión dopaminérgica.

### 3.2) Contaminantes Ambientales y Efectos a Largo Plazo:

Recientemente se ha demostrado que los Disruptores Endocrinos (EDCs) pueden afectar distintas funciones fisiológicas mediante su acción endocrina en el organismo. Las consecuencias de la exposición a estos compuestos están relacionadas principalmente con disfunciones en el metabolismo y la reproducción, a través de cambios epigenéticos en los periodos tempranos del desarrollo. Esta exposición temprana puede generar consecuencias a largo plazo, incluso presentar efectos a nivel transgeneracional [62]. Es así como, en el último tiempo se han caracterizado nuevos EDCs que poseen actividad hormonal androgénica y estrogénica, que pueden ejercer efectos a nivel del SNC alterando áreas cerebrales sensibles a la acción de hormonas sexuales [62].

Actualmente, el estudio del *programming* provocado por EDCs es relevante en las áreas de toxicología ambiental, debido a los efectos que este tipo de compuestos pueden tener a largo plazo en la salud de animales y humanos, y por su capacidad de bioacumularse en seres vivos. De esta manera, asociado a nuestro protocolo de exposición neonatal a hormonas sexuales, se puede establecer que la intervención sobre ventanas sensibles del desarrollo pueden ser afectadas por los EDCs y provocar efectos deletéreos a largo plazo en tejidos y órganos sensibles a la acción de hormonas. Nuestro laboratorio tiene especial interés en los efectos producidos por este tipo de programación sobre áreas involucradas en conductas motivadas, recompensa y el movimiento. Por ejemplo, BPA (un EDCs producido por la industria del plástico) tiene efectos estrogénicos y se ha demostrado en la literatura que la exposición temprana a este compuesto afecta a proteínas

dopaminérgicas como el DAT [63]. Por otro lado, a nivel conductual la exposición prenatal y postnatal a BPA produce conductas tipo ansiosas en roedores [63,64]. Estos ejemplos nos demuestran que el concepto de *programming* por EDCs tiene relevancia a nivel del SNC y no solo a nivel de tejidos reproductivos.

Algunos EDCs como el “aroclor 1254” una mezcla de Bifenilos Policlorados (PCBs), tienen actividad androgénica directa sobre AR [65], produciendo en hipotálamo de ratas hembras una disminución de la expresión de AR y cambios de expresión de enzimas metabolizadoras de andrógenos [66]. Es importante caracterizar los efectos de los andrógenos en periodos sensibles del desarrollo, ya que son un medio de prueba para la evaluación de compuestos contaminantes ambientales con actividad hormonal.

### **3.3) Proyecciones Futuras:**

En el futuro es necesario indagar más sobre los efectos de moléculas androgénicas sobre periodos sensibles del desarrollo del SNC y sobre cambios en los patrones de expresión de genes inducidos por estas hormonas. Además, ciertas patologías como el Síndrome Adrenogenital (aumento en la síntesis de andrógenos de la glándula adrenal) y la Pubertad Precoz de Origen Central (adelantamiento de la pubarquia) han sido asociados con elevados niveles séricos de andrógenos que a edades tempranas pueden favorecer cambios conductuales y predisponer a trastornos neuropsiquiátricos.

## CONCLUSIONES

- ❖ La administración neonatal de andrógenos produce a largo plazo alteraciones en tejidos sensibles de machos y hembras. Por ejemplo, en machos se reduce el tamaño testicular y en hembras el tamaño ovárico.
- ❖ La administración neonatal de TP produce un aumento en el contenido de DA en SN-VTA en ratas machos adultas, mientras que la administración neonatal a DHT no afecta el contenido de DA en SN-VTA.
- ❖ La administración neonatal a DHT produce una disminución en el contenido de DA en SN-VTA en ratas hembras adultas, mientras que la administración de TP no afecta en contenido de DA en SN-VTA.
- ❖ La liberación de DA en NAcc inducida por anfetamina intra-NAcc no produjo cambios significativos entre los grupos experimentales de ambos sexos. Sin embargo, la administración sistémica de anfetamina en ratas hembras tratadas con andrógenos (TP y DHT) disminuyó la liberación de DA en NAcc en la vida adulta.

- ❖ La liberación de DA inducida por un estímulo depolarizante ( $K^+$  70 mM) en ratas hembras y machos tratadas con TP al DPN-1 fue mayor que sus respectivos grupos control y DHT al DPN-60.
  
- ❖ La actividad locomotora acumulativa basal aumentó significativamente al DPN-60 en ratas hembras y machos tratadas con DHT al DPN-1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. UNODC. Informe Mundial sobre las Drogas. 1979/08/01 ed. Viena, Austria: Naciones Unidas; 2012:231-233
2. SENDA. Décimo Estudio Nacional de Drogas en Población General. 1979/08/01 ed. Santiago, Chile: Gobierno de Chile; 2013:231-233
3. Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991;156:38-50; discussion 50-35
4. Schulz KM, Molenda-Figueira HA, Sisk CL. Back to the future: The organizational-activational hypothesis adapted to puberty and adolescence. *Horm Behav* 2009;55:597-604
5. Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 1959;65:369-382
6. Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 1961;68:62-67
7. Barraclough CA, Gorski RA. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 1961;68:68-79
8. 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. *Fertil Steril* 2011;96:1490-1496
9. Bassareo V, Di Chiara G. Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 1997;17:851-861
10. Pfau JG, Damsma G, Nomikos GG, et al. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res* 1990;530:345-348
11. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:217-238
12. Wise RA. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002;36:229-240
13. Kalivas PW, Volkow ND. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 2005;162:1403-1413
14. Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5274-5278
15. Morikawa H, Paladini CA. Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms. *Neuroscience* 2011;198:95-111
16. Peper JS, van den Heuvel MP, Mandl RC, Hulshoff Pol HE, van Honk J. Sex steroids and connectivity in the human brain: a review of neuroimaging studies. *Psychoneuroendocrinology* 2011;36:1101-1113
17. Brooks RV. Androgens. *Clinics in endocrinology and metabolism* 1975;4:503-520
18. Amory JK, Anawalt BD, Matsumoto AM, et al. The effect of 5alpha-reductase inhibition with dutasteride and finasteride on bone mineral density, serum lipoproteins,

- hemoglobin, prostate specific antigen and sexual function in healthy young men. *The Journal of urology* 2008;179:2333-2338
19. Randall VA. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* 1994;8:405-431
  20. Randall VA. Androgens and human hair growth. *Clinical endocrinology* 1994;40:439-457
  21. 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
  22. Celotti F, Negri-Cesi P, Poletti A. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5alpha-reduction and aromatization. *Brain research bulletin* 1997;44:365-375
  23. Lephart ED. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;61:375-380
  24. Lenz B, Muller CP, Stoessel C, et al. Sex hormone activity in alcohol addiction: integrating organizational and activational effects. *Progress in neurobiology* 2012;96:136-163
  25. Sheridan PJ. Autoradiographic localization of steroid receptors in the brain. *Clinical neuropharmacology* 1984;7:281-295
  26. Matsuda K, Sakamoto H, Kawata M. Androgen action in the brain and spinal cord for the regulation of male sexual behaviors. *Current opinion in pharmacology* 2008;8:747-751
  27. Sundblad C, Eriksson E. Reduced extracellular levels of serotonin in the amygdala of androgenized female rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997;7:253-259
  28. King JA, Barkley RA, Delville Y, Ferris CF. Early androgen treatment decreases cognitive function and catecholamine innervation in an animal model of ADHD. *Behavioural brain research* 2000;107:35-43
  29. Oliveira M, Leao P, Rodrigues AJ, et al. Programming effects of antenatal corticosteroids exposure in male sexual behavior. *The journal of sexual medicine* 2011;8:1965-1974
  30. Sotomayor-Zarate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 2008;78:673-680
  31. 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
  32. Abarca J, Bustos G. Differential regulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyrate release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum after partial and extensive lesions to the nigro-striatal dopamine pathway. *Neurochem Int* 1999;35:19-33
  33. Torrens Y, Beaujouan JC, Besson MJ, Michelot R, Glowinski J. Inhibitory effects of GABA, L-glutamic acid and nicotine on the potassium-evoked release of substance P in substantia nigra slices of the rat. *Eur J Pharmacol* 1981;71:383-392
  34. Chi JD, Odontiadis J, Franklin M. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;731:361-367
  35. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.; 2005
  36. Hall JE. "Guyton y Hall Tratado de Fisiología Médica" Decimosegunda Edición ed. Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2011
  37. Cruz G, Barra R, Gonzalez D, Sotomayor-Zarate R, Lara HE. Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertil Steril* 2012;98:1283-1290

38. Picon R, Pelloux MC, Benhaim A, Gloaguen F. Conversion of androgen to estrogen by the rat fetal and neonatal female gonad: effects of dcAMP and FSH. *Journal of steroid biochemistry* 1985;23:995-1000
39. Ganong WF. *Fisiología Médica*. Vigésima Edición ed. México, D.F.: Editorial El Manual Moderno, México; 2006
40. Yuan X, He Y, Liu J, et al. Expression of androgen receptor and its co-localization with estrogen receptor-alpha in the developing pituitary gland of sheep fetus. *Histochem Cell Biol* 2007;127:423-432
41. Robinson J. Prenatal programming of the female reproductive neuroendocrine system by androgens. *Reproduction* 2006;132:539-547
42. Handa RJ, Gorski RA. Alterations in the onset of ovulatory failure and gonadotropin secretion following steroid administration to lightly androgenized female rats. *Biol Reprod* 1985;32:248-256
43. Persky RW, Liu F, Xu Y, et al. Neonatal testosterone exposure protects adult male rats from stroke. *Neuroendocrinology* 2012;97:271-282
44. 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
45. Kuppens E, Ivanova T, Karolczak M, et al. Classical and nonclassical estrogen action in the developing midbrain. *Horm Behav* 2001;40:196-202
46. 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
47. Cummings JA, Jagannathan L, Jackson LR, Becker JB. Sex differences in the effects of estradiol in the nucleus accumbens and striatum on the response to cocaine: neurochemistry and behavior. *Drug Alcohol Depend* 2014;135:22-28
48. Johnson ML, Ho CC, Day AE, et al. Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain. *J Neuroendocrinol* 2010;22:226-237
49. Cruz G, Riquelme R, Espinosa P, et al. Neonatal Exposure to Estradiol Valerate Increases Dopamine Content in Nigrostriatal Pathway During Adulthood in the Rat. *Horm Metab Res* 2014
50. Johnson ML, Day AE, Ho CC, et al. Androgen decreases dopamine neurone survival in rat midbrain. *J Neuroendocrinol* 2010;22:238-247
51. Beyer C. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol (Berl)* 1999;199:379-390
52. Maharjan S, Serova L, Sabban EL. Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors alpha and beta and interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* 2005;93:1502-1514
53. Maharjan S, Serova LI, Sabban EL. Membrane-initiated estradiol signaling increases tyrosine hydroxylase promoter activity with ER alpha in PC12 cells. *J Neurochem* 2010;112:42-55
54. Sitte HH, Freissmuth M. The reverse operation of Na(+)/Cl(-)-coupled neurotransmitter transporters--why amphetamines take two to tango. *J Neurochem* 2009;112:340-355
55. Kipp M, Karakaya S, Pawlak J, et al. Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:376-390

56. Purves-Tyson TD, Owens SJ, Double KL, et al. Testosterone induces molecular changes in dopamine signaling pathway molecules in the adolescent male rat nigrostriatal pathway. *PLoS One* 2014;9:e91151
57. Chen CV, Brummet JL, Lonstein JS, Jordan CL, Breedlove SM. New knockout model confirms a role for androgen receptors in regulating anxiety-like behaviors and HPA response in mice. *Horm Behav* 2014;65:211-218
58. Imamura T. Epigenetic setting for long-term expression of estrogen receptor alpha and androgen receptor in cells. *Horm Behav* 2011;59:345-352
59. Coghill DR, Caballero B, Sorooshian S, Civil R. A systematic review of the safety of lisdexamfetamine dimesylate. *CNS drugs* 2014;28:497-511
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. Kurian JR, Olesen KM, Auger AP. Sex differences in epigenetic regulation of the estrogen receptor-alpha promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology* 2010;151:2297-2305
62. Walker DM, Gore AC. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:197-207
63. Tian YH, Baek JH, Lee SY, Jang CG. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse* 2010;64:432-439
64. Ishido M, Masuo Y, Kunimoto M, Oka S, Morita M. Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J Neurosci Res* 2004;76:423-433
65. Casati L, Sendra R, Poletti A, Negri-Cesi P, Celotti F. Androgen receptor activation by polychlorinated biphenyls: epigenetic effects mediated by the histone demethylase Jarid1b. *Epigenetics* 2013;8:1061-1068
66. Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, et al. Prenatal Aroclor 1254 exposure and brain sexual differentiation: effect on the expression of testosterone metabolizing enzymes and androgen receptors in the hypothalamus of male and female rats. *Reprod Toxicol* 2006;22:738-745