

**Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Tecnología Médica**

Proyecto

**“Efectos de exposición neonatal a hormonas sexuales en la expresión de
proteínas involucradas en la vía dopaminérgica de ratas adultas”
Medidos mediante inmunofluorescencia**

Autores:

Camila Fernanda Leiva Castro, 19.614.526-5, +56972382999, camiferleiva@gmail.com
Camila Ormazabal Ibacache, 19.038.466-7, +56950017930, camila.ormabazali@gmail.com
Sebastian Pérez Basáez, 18.584.520-6, +56979455173, sebperbas@aol.com
Catalina Antonia Ross Poblete, 19.842.402-1, +56950191816, cata.rossp9@gmail.com

Profesor Guía:

Ramón Sotomayor-Zárate, Químico Farmaceuta, +56 9 9236 0913, ramon.sotomayor@uv.cl,
Profesor Adjunto, Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, Instituto de Fisiología.
Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.

Proyecto de investigación:

“Neonatal programming: Sex hormones excess disrupts midbrain dopamine function in the
adulthood”.

Instituto de Fisiología UV.

Profesor/investigador a cargo del Proyecto: Ramón Sotomayor-Zárate,
Financiamiento/auspicio del Proyecto: FONDECYT

Proyecto “Efectos de exposición neonatal a hormonas sexuales en la expresión de
proteínas involucradas en la vía dopaminérgica de ratas adultas”

1. ALUMNOS (agregue casilleros para más integrantes si corresponde)

Nombre	Camila Fernanda Leiva Castro
Cédula identidad	19.614.526-5
Teléfono	+56972382999
Correo electrónico	camiferleiva@gmail.com
Nombre	Camila Ormazabal Ibacache
Cédula identidad	19.038.466-7
Teléfono	+56950017930
Correo electrónico	camila.ormabazali@gmail.com
Nombre	Sebastian Pérez Basáez
Cédula identidad	18.584.520-6
Teléfono	+56979455173
Correo electrónico	sebperbas@aol.com
Nombre	Catalina Antonia Ross Poblete
Cédula identidad	19.842.402-1
Teléfono	+56950191816
Correo electrónico	cata.rossp9@gmail.com

1. PROFESOR GUÍA

Nombre	Ramón Sotomayor-Zárate.
Profesión	Químico Farmaceuta
Teléfono	+56 9 9236 0913
Correo electrónico	ramon.sotomayor@uv.cl
Cargo e institución a la que pertenece	Profesor Adjunto Laboratorio de Neuroquímica y Neurofarmacología, Instituto de Fisiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.

1. Si su proyecto está circunscrito a un Proyecto de Investigación, indique:

Nombre del Proyecto	“Neonatal programming: Sex hormones excess disrupts midbrain dopamine function in the adulthood.”
Institución	Instituto de Fisiología UV
Profesor/investigador a cargo del Proyecto	Ramón Sotomayor-Zárate
Financiamiento/auspicio del Proyecto	FONDECYT

Resumen:

Las hormonas sexuales tienen efectos en diversos tejidos sensibles a través de la expresión de receptores específicos. Estas se caracterizan por su capacidad de difusión simple a través de la membrana celular, produciendo diversos efectos fisiológicos -crecimiento, diferenciación y regulación de órganos del sistema reproductor-. Sin embargo, otros tejidos no reproductivos, como hígado, hueso, músculo y cerebro, son también sensibles a su acción. A nivel cerebral se caracterizan por actuar como “esteroides neuroactivos”, produciendo efectos neuroendocrinos a nivel del diencéfalo, mesencéfalo y telencéfalo.

La reprogramación se define como la “redirección fisiológica de un tejido u órgano por un estímulo, en un periodo sensible de desarrollo, que produce cambios funcionales adversos en la adultez”. Actualmente este concepto ha tomado una gran importancia debido a condiciones que llevan a recién nacidos a exposición de xenobióticos, como infecciones tempranas, exposición a antibióticos y tratamientos a embarazadas con antidepresivos/antipsicóticos durante este periodo. Así mismo, algunas condiciones fisiopatológicas -como el síndrome de ovario poliquístico- o la exposición acumulativa a compuestos con actividad endocrina (ej. Bisfenol A) o anticonceptivos orales generan resultados disruptivos en el desarrollo.

A nivel neuroquímico, la dopamina (DA) corresponde un neurotransmisor de tipo catecolamina, involucrado en la regulación de la secreción de prolactina, control motor y circuito de recompensa. Este último es regulado por el Circuito Mesocorticolímbico, y libera DA en respuesta a determinados estímulos (actividades sexuales, consumo de drogas de abuso y algunas conductas). A nivel cortical, la exposición repetida a estas señales produce cambios neuroplásticos a largo plazo.

A pesar de que los efectos de las hormonas sexuales son conocidos se conoce muy poco de los efectos de la exposición temprana a estas sobre la neurotransmisión dopaminérgica, generando incertidumbre sobre las posibles consecuencias que estas pueden causar a largo plazo, de manera que un mejor entendimiento de las bases moleculares de las señales involucradas en las adicciones se hace imperativo.

Palabras clave

- Síntesis y metabolismo de dopamina
- Vía dopaminérgica
- Hormonas sexuales y efecto cerebrales
- Tirosina hidroxilasa
- Reprogramación

Introducción

Los neurotransmisores de tipo monoaminas (dopamina, serotonina e histamina) corresponden a un grupo de moléculas de señalización de pequeño tamaño producidos por neuronas monoaminérgicas comparten como característica común tener una inusual pero relevante organización funcional a nivel cerebral. En el caso de las neuronas dopaminérgicas, estas tienen sus cuerpos celulares distribuidos entre el hipotálamo y tallo cerebral, sin embargo, sus axones se proyectan ampliamente a lo largo del sistema nervioso que permite a estos neurotransmisores realizar una función regulatoria de manera coordinada. Estas neuronas poseen en específico sus cuerpos celulares en el mesencéfalo en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SN) y el Área Tegmental Ventral (VTA). La dopamina (DA) como neurotransmisor es además producida por neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo. Las neuronas dopaminérgicas pertenecientes al mesencéfalo se proyectan ampliamente al cerebro anterior, influenciando motivación, comportamiento motor, y múltiples formas de memoria, en cambio, la DA producida por las neuronas hipotalámicas es considerada una hormona ya que a través del sistema venoso portal inhibe la producción de prolactina por parte de la hipófisis [1]

Al ser un neurotransmisor producido a partir de un aminoácido, se requieren de una serie de pasos metabólicos que permiten su formación y su eventual accionar para la generación de ciertas señales.

1. Formación y metabolización:

La biosíntesis de neurotransmisores de tipo catecolamina comienza con la tirosina que se transporta activamente al cerebro. Y es obtenida por la dieta o de la hidroxilación del aminoácido esencial fenilalanina. A partir de la presencia de tirosina a nivel neuronal, esta será sintetizada en los terminales axónicos con el fin de obtener DA [2]

La síntesis de DA involucra un conjunto de reacciones enzimáticas, siendo la tirosina hidroxilasa (TH) la enzima limitante de este proceso y marcador celular de neuronas dopaminérgicas [3]. La TH es parte de una familia de enzimas que contiene aminoácidos aromáticos así como otras enzimas hidroxilasas, fenilalanina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa [4].

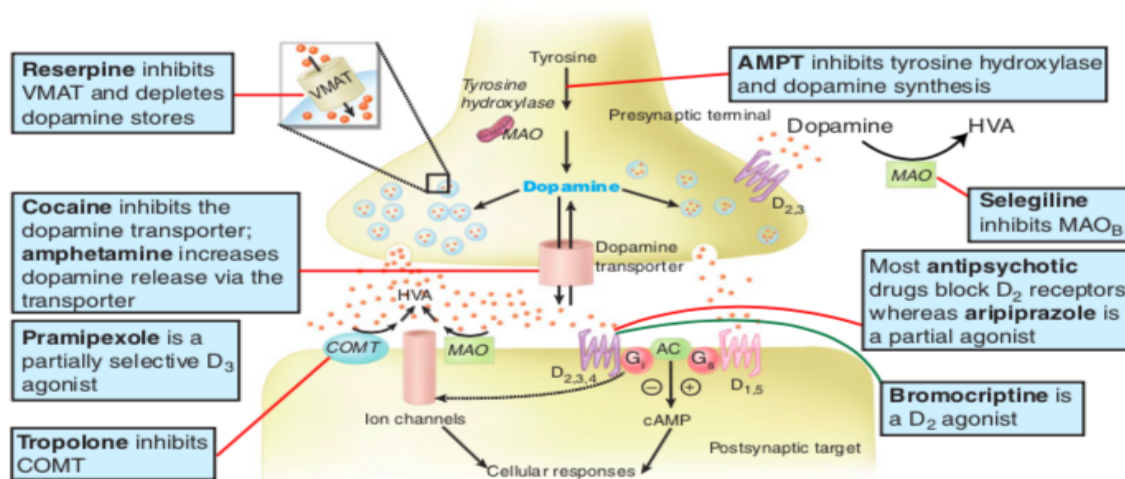


Figura 1: Modelo de Se muestran entidades moleculares presinápticas y postsinápticas involucradas en la síntesis, liberación, señalización y recaptación de DA. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. New York: McGraw-Hill; 2015

La TH requiere ión Fe^{2+} como cofactor, así como el oxígeno molecular y la tetrahidrobiopterina (un donante de hidrógeno). Además, la TH es la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas y es regulada por múltiples mecanismos, siendo incluso el aumento de la liberación de catecolaminas uno de los estímulos que conlleva un aumento de su actividad catalítica. Otras señales también generan un aumento de su actividad y expresión, dentro de las que podemos encontrar al estrés ambiental crónico y medicamentos como la cafeína, la nicotina y la morfina. Por otro lado, la actividad de la TH puede verse disminuida por fármacos antidepresivos entre otros [5].

El producto final de TH -L-Dopa- es el target de la enzima L-Aminoácido Aromático descarboxilasa (AADC), encargada de la descarboxilación de L-Dopa a DA en neuronas dopaminérgicas. Esta enzima tiene una ubicación citoplásmica que requiere piridoxal fosfato (un cofactor derivado de la vitamina B6) y tiene una acción catalítica mucho más rápida que TH [1].

En general, los neurotransmisores producidos a partir de aminoácidos son metabolizados por la enzima Monoamino Oxidasa (MAO, tipos A y B) y por la Catecol-O-Metiltransferasa (COMT) a nivel de la neurona postsináptica, las cuales son expresadas tanto intracelular como extracelularmente. A partir de este proceso los principales metabolitos de la DA son DOPAC (ácido dihidroxifenilacético -producido por la MAO-) y el ácido homovanílico (HVA -producido por la COMT-) [1, 5].

Una vez sintetizada, la dopamina será el principal neurotransmisor en las Vías Dopaminérgicas, las cuales corresponden a rutas de neuronas que transmiten DA por varias regiones del cerebro, desde su formación en una neurona presináptica a partir de la tirosina, hasta su unión a un receptor en una neurona postsináptica. Existen principalmente tres vías neuronales dopaminérgicas: Mesolímbica (somatos en el VTA y proyecciones al núcleo accumbens), mesocortical (somatos en el VTA y proyecciones a la corteza prefrontal),

nigroestriatal (somas en SN y proyecciones a cuerpo estriado) y vía tuberoinfundibular (neuronas dopaminérgicas hipotalámicas del núcleo arcuato). De todas estas vías dopaminérgicas se produce liberación de DA [6].

El circuito mesocorticolímbico o de la recompensa está formado por estructuras neuroanatómicas, como el VTA, núcleo accumbens (NAc) y ciertas regiones de la corteza prefrontal (CPF), las cuales van a generar la percepción del placer y reforzamiento positivo, ya sea por recompensas naturales (comida, sexo o interacciones sociales por ejemplo) o por drogas de abuso como cocaína y anfetamina. [3]

A nivel neuroquímico, el NAc y la CPF reciben inervaciones dopaminérgicas provenientes del VTA, las cuales se activan y liberan DA en respuesta a los estímulos de recompensa natural [3] o por drogas de abuso (cocaína, anfetamina, opioides, nicotina, etc). Todos estos estímulos producen efectos placenteros a través del aumento extracelular de DA en NAc). A nivel cortical, la exposición repetida a estas drogas generará cambios neuroplásticos en la CPF, la cual afecta la toma de decisiones y la motivación dirigida al cumplimiento de objetivos, llevando a favorecer las conductas de consumo compulsivo, por sistema de recompensa [4]

Las vías dopaminérgicas son sensibles a la acción de xenobióticos (como las hormonas sexuales o disruptores endocrinos) que a través de la unión a proteínas receptoras pueden afectar la síntesis o degradación de DA.

En resumen, las proteínas involucradas en la síntesis y degradación de la DA pueden ser afectadas por una serie de sustancias, entre ellas las hormonas sexuales, donde a nivel de circuitos nigroestriatales y mesocorticolímbicos ejercen un rol en la expresión de proteínas críticas para la función dopaminérgica, como la TH [4].

3. Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales

Las hormonas sexuales producidas por las gónadas tienen efectos en diversos tejidos que son sensibles a su acción, a través de la expresión de receptores específicos. Estas se caracterizan desde el punto de vista fisicoquímico por su lipofilia que les permite cruzar por difusión simple la membrana celular. Por este motivo, la localización celular de sus receptores es principalmente citoplasmática, produciendo diversos efectos fisiológicos, como crecimiento, diferenciación y regulación de órganos del sistema reproductor. Sin embargo, otros tejidos no reproductivos como hígado, hueso, músculo y cerebro son sensibles a la acción de las hormonas sexuales [2]. A este nivel, las hormonas sexuales actúan como “esteroides neuroactivos”, produciendo efectos neuroendocrinos a nivel del diencefalo, mesencefalo y telencefalo [9]. Para efectos prácticos categorizamos a las hormonas sexuales en dos grupos: andrógenos y estrógenos.

3.1 Andr6genos:

El principal andr6geno corresponde a la testosterona, y es producida por los test6culos, y es responsable de la diferenciaci6n de los 6rganos reproductivos y de la masculinizaci6n del cerebro [10].

Los andr6genos en realizan su efecto mediante la uni6n a su receptor citoplasmático, el cual al ser activados por la uni6n de su ligando actúan como factores de transcripci6n, acoplándose a un sitio espec6fico en el ADN conocido como elementos de respuesta a hormonas (HREs), lo que inicia la activaci6n o represi6n de diferentes genes y su subsecuente traducci6n proteica [10]. La testosterona tambi6n es capaz de ejercer acci6n a trav6s de sus diferentes metabolitos, dihidrotestosterona y 17 β -estradiol (E2), este 6ltimo es producido por la enzima aromatasa, la cual se expresa en m6ltiples n6cleos cerebrales [11-12]. Tanto hombres como mujeres expresan a la enzima aromatasa en las mismas 6reas cerebrales como hipotálamo, n6cleos supra6pticos, n6cleos de la estría terminal, amígdala, n6cleo septal y cerebelo entre otros [12, 13].

3.2 Estr6genos.

En mujeres el estr6geno m6s potente es el E2, y ejerce su acci6n mediante la uni6n a sus receptores citos6licos tipo alfa (ER α) y beta (ER β) que se expresan de manera diferencial en variados tejidos, incluyendo el cerebro [14 -15]. Estos indistintamente, se caracterizan que al ser activados por su ligando reaccionan con un sitio espec6fico del ADN (ERE: *elementos de respuesta a estr6genos*), induciendo a cambios relacionados con transcripci6n de genes a mRNA , cambios en estructura de la cromatina y reclutamiento de maquinaria transcripcional [16].

A pesar que los efectos de las hormonas sexuales son conocidos en tejidos reproductivos y no reproductivos, se conoce muy poco de los efectos la exposici6n temprana a hormonas sexuales sobre la neurotransmisi6n dopamin6rgica a largo plazo. En este sentido, a continuaci6n revisaremos en concepto de reprogramaci6n.

4. Concepto de reprogramaci6n:

Lucas defini6 en 1991 el concepto de reprogramaci6n como "La redirecci6n fisiol6gica de un tejido u 6rgano por un est6mulo, en un periodo sensible de desarrollo, que produce cambios funcionales adversos en la adultez " [8]. Actualmente este concepto ha tomado una gran importancia debido a condiciones que llevan a reci6n nacidos a exposici6n de xenobi6ticos, como infecciones tempranas, exposici6n a antibi6ticos y tratamiento a embarazadas con medicamentos como hormonas tiroideas en hipotiroidismo o antidepresivos/antipsic6ticos para trastornos neuropsiquiátricos durante el embarazo. Respecto a hormonas sexuales, algunas condiciones fisiopatol6gicas como el s6ndrome de ovario poliquístico lleva a un aumento de las concentraciones s6ricas de andr6genos durante el embarazo o la exposici6n acumulativa a compuestos con actividad endocrina, como disruptores (ej. Bisfenol A) o anticonceptivos orales.

HIPÓTESIS

La exposición temprana a hormonas sexuales de tipo andrógeno y estrógeno en animales de experimentación en periodo de desarrollo aumenta la expresión TH y señalización celular de esta vía (receptores D₁) en la Sustancia Nigra Pars compacta y VTA.

Objetivo general:

- Determinar los efectos de la exposición temprana a hormonas sexuales en el periodo de desarrollo de animales de experimentación en la expresión las proteínas involucradas en producción dopaminérgica (*Tirosina hidroxilasa* -TH-) y señalización celular de este neurotransmisor (receptores D₁).

Objetivos específicos:

- Describir la ubicación de receptores dopaminérgicos D₁ en tejido de ratas de 60 días de edad de ambos sexos que fueron expuestas durante las primeras horas postnatales a hormonas sexuales (Estradiol Valerato -EV- y Testosterona Propionato -TP-).
- Describir posibles cambios en la localización y concentración en la expresión la enzima *Tirosina hidroxilasa* -TH- a nivel de los somas de neuronas pertenecientes al *Área Ventral Tegmental* -VTA- y *Sustancia Nigra* -SN- en ratas con 60 días de edad en ratas expuestas que fueron expuestas en un periodo neonatal a hormonas sexuales.
- Comparar cantidad y ubicación de los receptores D₁ encefálicos de ratas de 60 días de vida postnatal expuestas a hormonas sexuales con muestras de tejido encefálico normal obtenido a partir de ratas pertenecientes al grupo control.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sujetos de estudio: Ratas adultas de la especie *Rattus albinus* cepa Sprague Dawley

- Los animales fueron criados en un cuarto con temperatura controlada (con $21 \pm 2^\circ\text{C}$) bajo un ciclo de 12 horas de luz a partir de las 8:00 AM, con comida y agua *ad libitum*
- Los procedimientos experimentales en los sujetos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencia, Universidad de Valparaíso y la Junta de Ética de Experimentación Animal institucional y el Consejo de Ciencia (FONDECYT)
- El diseño experimental de este estudio incluyó un grupo control paralelo formado por ratas de ambos sexos. Por lo tanto por cada objetivo específico, habrá animales tratados y controles. Cabe señalar que este estudio no es ciego, ya que el investigador responsable y los co-investigadores van a identificar a los grupos de animales tratados y controles.
- Cálculo del Número de Animales que son utilizados (n-muestral): Para el cálculo de animales por cada grupo experimental se utilizó una hoja de cálculo de tamaño muestral disponible para ser descargada en la siguiente página web <http://oep.umh.es/calculo-del-tamano-muestral/> y que pertenece a la oficina evaluadora de proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche, España. Esta tabla permite calcular el tamaño muestral a partir de 2 medias y desviaciones estándar para cada grupo experimental estimadas por el paper “Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats” [23].

TABLE 1: Substantia nigra-ventral tegmental area (SN-VTA) DA and DOPAC levels from control, TP, DHT, and EV adult male rats.

Group	DA (pg/mg protein)	SEM	DOPAC (pg/mg protein)	SEM	DOPAC/DA	SEM	P value	n
C	7985.3	2029.6	2450.9	603.6	0.3532	0.0491	—	6
TP	17407.5	4388.6	3175.9	538.5	0.2913	0.0654	0.457	6
DHT	5765.8	858.8	1889.2	277.3	0.3121	0.0329	0.574	6
EV	20744.0	4007.3	4109.1	635.3	0.2117	0.0208	0.030*	6

DA: dopamine; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. * P value < 0.05 when comparing the ratio (DOPAC/DA) to the control group.

Figura 2: concentración de dopamina y DOPAC en SN y VTA en ratas control (C) y tratado (EV) con sus respectivos Errores Muestrales Medios (SEM); Espinosa P, Silva RA, Sanguinetti NK, Venegas FC, Riquelme R, González LF, et al. Programming of dopaminergic neurons by neonatal sex hormone exposure: effects on dopamine content and tyrosine hydroxylase expression in adult male rats.

De la tabla anterior corresponde al contenido de DA en SN-VTA en ratas machos tratadas con hormonas sexuales. Donde se consideraron los datos de la segunda columna correspondiente al error estándar medio (SEM) junto al n utilizado. Para obtener de así la desviación estándar (SD) mediante la fórmula $SD = SEM \times n$.

Se usaron los datos expresados de la primera columna correspondiente al contenido de DA y las desviación estándar obtenida para aplicarlos en la hoja de cálculo antes señalada.

Finalmente se acordó un tamaño muestral según los parámetros con un nivel de significancia de $P = 0,05$ junto a una potencia del 80%. Dando como resultado 6 ratas por grupo, contando en total de 24 ratas, 12 para EV, siendo 6 masculinas y 6 femeninas y asimismo 12 para control, 6 masculinas y 6 femeninas.

I - Cálculos del tamaño muestral para una diferencia de medias					Table for (Z1-alpha/2+Z1-beta)squared				
Valores previstos					beta				
Media	Desviación estándar				alpha	0,05	0,1	0,2	0,5
Grupo 1	7985	4970		Diferencia de medias= 159,7871 %	0,1	10,8	8,6	6,2	2,7
Grupo 2	20744	9815			0,05	13	10,5	7,8	3,8
					0,02	15,8	13	10	5,4
					0,01	17,8	14,9	11,7	6,6
Las celdas en la tabla de abajo muestran el número estimado de individuos necesitados en cada grupo con el fin de demostrar diferencias estadísticamente significativas a valores "p" que oscilan entre 0.10 - 0.01 y varios niveles de potencia.									
Potencia es la probabilidad de encontrar una diferencia estadísticamente significativa en un valor "p" dado con el número especificado de individuos en cada grupo.									
Tamaño muestral necesitado en cada grupo									
alpha level (valor "p")	Potencia								
	95%	90%	80%	50%					
0,10	8	6	5	2					
0,05	10	8	6	3					
0,02	12	10	7	4					
0,01	13	11	9	5					
* Nota: rellene los cuadros con fondo azul									

Figura 3: Oficina de Investigación Responsable [Internet]. Oficina de Investigación Responsable. Tamaño muestral. Available from: <http://oep.umh.es/calculo-del-tamano-muestral/>. Universidad Miguel Hernández de Elche, España.

2. Reactivos.

- Estradiol valerato
- EDTA
- Ácido 1-octanosulfónico
- Aceite de Sésamo

3. Administración de EV y aceite de sésamo.

Cada grupo de animales fue inyectado una única vez en el día postnatal (PND 1) con 0,1 mg de EV (para aquellas ratas pertenecientes al grupo tratado) o aceite de sésamo (para las pertenecientes al grupo control) por cría en forma subcutánea. En el caso de EV se disolvió en 50 µl de aceite de sésamo.

Las dosis de TP y EV fueron previamente publicadas [17 - 19]

Todas las crías fueron mantenidas con su madre hasta el destete a la edad de 21 días posnatales. Luego del destete, las crías fueron ubicadas en grupos según sexo y tratamiento en jaulas estándares. A los 60 PND grupos de ratas serán seleccionadas azarosamente para seguir los siguientes protocolos experimentales

4. Registro de peso

Se llevó un registro diario del peso (excluyendo fines de semana y feriados) de los grupos control, TP y EV hasta el día de su eutanasia, lo que permitió observar y comparar las curvas de crecimiento entre las camadas y el efecto de la hormona utilizada.

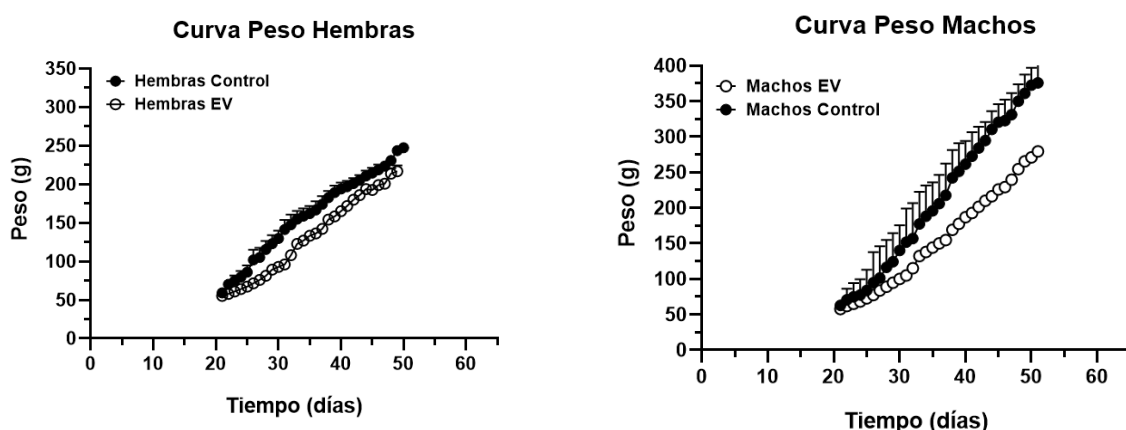


Figura 4: gráfica de curvas de peso para hembras control y EV (grafica de la izquierda) y machos control y EV (gráfica de la derecha).

5. Registro de la Etapa del Ciclo Estral

Para las ratas hembra de los grupos control, EV y TP, se registrará la etapa del ciclo estral desde el día 40 hasta el día 60. La fecha de apertura vaginal se registrará en las ratas hembra de ambos grupos experimentales, como una medida de inicio de la pubertad [20].

El ciclo estral se evaluará por el análisis de lavados vaginales diarios con un microscopio óptico, comparando las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroidales y que caracterizan a las etapas periovulatorias [21]

- Proestro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 12 a 24 horas y que citológicamente se caracteriza gran cantidad de células nucleadas bien redondeadas.
- Estro: Etapa del ciclo estral de la rata de duración entre 24 a 48 horas, hay aceptación del macho. Citológicamente se caracteriza por presencia de células epiteliales queratinizadas o escamosas
- 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.

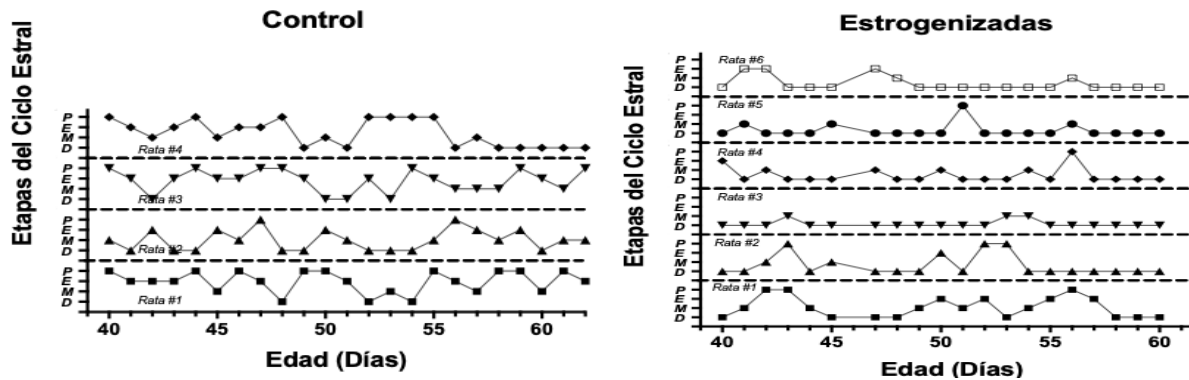


Figura 4: gráfica de registro de ciclo estral de ratas hembras, tanto control (izquierda) como EV (derecha) desde el día 40 al día 60.

6. Obtención de las muestras y Preparación del tejido

-Solucion de perfusion: PFA 4% en PBS

Las ratas, alcanzados los 60 días PND, fueron anestesiadas con hidrato cloral 8% (dosis determinada por el peso) mediante inyección intraperitoneal y perfundidas a través del ventrículo izquierdo (en dirección a la circulación mayor); inicialmente se perfundió una solución PBS o suero fisiológico a 4°C hasta eliminar la sangre circulante; luego se usó solución de perfusión, paraformaldehído al 4% (300 ml por rata). Posterior a esto, se decapitó al animal y se extrajo el cerebro, para posteriormente incubarlo en PFA 4% durante 2 horas a 4°C y luego en sacarosa al 30% durante 48 horas para su deshidratación [17, 22].

Una vez fijadas y deshidratadas, las áreas de interés (VTA y Sustancia Nigra) estas fueron seccionadas con cortes coronales en el criostato a 15 micras de grosor donde posteriormente se seleccionaron entre 10 y 20 cortes de VTA y de Sustancia Nigra respectivamente, localizados a 5,4 mm de bregma de acuerdo al atlas *Paxinos y Watson*. También se usaron como tejidos de control hipófisis-testículos en el caso del macho y hembras hipófisis- útero y ovarios.

Posteriormente, los cortes seleccionados fueron lavados con PBS, 6 lavados de 5 minutos cada uno, para proseguir con el protocolo de recuperación antigénica (RA) realizado en vaporera (5711-042, Oster) en buffer citrato a pH 6 por 20 minutos, seguido de un proceso de permeabilización, realizado con solución Tritón x 100 al 0,3% en PBS durante un periodo de 2 horas en un cámara húmeda.

A continuación se realizó la incubación del anticuerpo primario anti TH rabbit y anti-D1 rabbit (Calbiochem, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), ambos preparados a la dilución de 1:2000 en solución de bloqueo (suero de cabra 1% + BSA 1% en PBS; tritón al 0,05%) toda la noche en cámara húmeda a 4° C°, para finalizar con 6 lavados consecutivos de 5 minutos con solución de bloqueo.

La incubación con el anticuerpo secundario fue realizada en solución de bloqueo -previamente descrita- con los anticuerpos Alexa fluor 488 anti-rabbit y Alexa fluor 594 anti-rabbit (Thermofisher), a una concentración de 1:1000, para proseguir con 6 lavados consecutivos de 5 minutos cada uno en PBS.

Las muestras fueron posteriormente tratadas con tinción de contraste de tipo nuclear (DAPI), preparado en una concentración de 1:4000 en PBS al 0,05%. Los cortes ya marcados con los anticuerpos primarios y secundarios son incubados en la tinción de contraste por 10 minutos , para continuar con 3 lavados consecutivos de 10 minutos con PBS al 0,05%.

Finalmente las muestras fueron montadas en eukit, y almacenadas en contenedor con temperatura controlada (4°C) en oscuridad, listas para ser observadas en microscopía de epifluorescencia.

7. Análisis computacional :

Los cortes previamente marcados con la técnica de inmunofluorescencia ya descrita fueron observados y fotografiados con un microscopio de epifluorescencia para ser analizados con un software de análisis de imágenes digitales (ImageJ/Fiji), en el cual se trazaron los límites físicos del área a analizar, y con la ayuda de controles positivos y negativos se determinan los parámetros para la correcta determinación y conteo de señales verdaderamente positivas mediante su categorización en una escala continua basada en RGB. La información obtenida fue llevada a una base de datos para su cotejo y análisis estadístico correspondiente.

Se ha demostrado la precisión de el análisis de imagen por parte de la plataforma en un estudio de cáncer de mama, donde se comparó la revisión manual y digital de muestras inmunohistoquímicas, otorgando resultados equivalentes en un menor tiempo [24].

La utilización de este método de registro permite también el estandarizar los parámetros de conteo celular, de modo que esta forma sea reproducible y así evitar falsos positivos en los resultados finales de la investigación.

JUSTIFICACIÓN ÉTICA

La elección del método de eutanasia es de especial importancia en las consideraciones del manejo de animales de experimentación, ya que una elección errada de este puede llevar no sólo al sufrimiento y distress innecesario del sujeto de experimentación, sino que podrían llevar al desarrollo de artefactos histológicos y metabólicos que pueden alterar el desarrollo y resultados de la investigación, además se hace crucial tener en consideración el tiempo que existe entre la eutanasia misma y la recolección del tejido, hecho que también ciertamente afecta la elección del sistema que se usa en el sacrificio del animal.

Como se describió previamente, los animales a ser eutanizados son en una primera instancia anestesiados con hidrato cloral para luego ser perfundidos intracardialmente con una solución de PFA al 4% para ser finalmente decapitados y así extraer de manera segura el material encefálico. La aplicación de un protocolo de perfusión a un sujeto vivo está sólo permitida ante la previa y correcta sedación del animal de acuerdo a la American Veterinary Medical Association -AVMA-.

El hidrato cloral tiene una amplia historia como agente farmacéutico en la inducción de sedación y eutanasia en la práctica veterinaria en combinación con otros agentes anestésicos (especialmente en el caso de animales grandes). Este agente se caracteriza por su fácil manipulación, bajo costo, efectiva acción hipnótica y anestésica, esto lo hace ampliamente usado en las prácticas de laboratorio en que se realizan estudios de cerebro vasculatura en animales de experimentación, esto en combinación a la perfusión hecha en base a solución de PFA permite generar muestras con el menor grado de contaminación, haciendo justificable bajo los criterios de la American Veterinary Medical Association el uso de la posterior decapitación [25].

Finalmente, cabe destacar que los procedimientos experimentales planteados en este proyecto de tesis fueron aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso y otorgados al Proyecto Fondecyt Regular N° 116-0398 cuyo investigador responsable es el Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. En este proyecto de tesis, se harán todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados en este proyecto y su sufrimiento.

“Efectos de hormonas sexuales en la expresión de proteínas involucradas en la vía dopaminérgica en ratas”

Según la intervención del investigador: Experimental, debido a que se incluyen las intervenciones en el desarrollo de ratas de experimentación y la toma de resultados de estas.

Según la toma de datos: Prospectivo, a partir de los resultados obtenidos en programación tisular temprana por medio de hormonas sexuales en ratas neonatales

Número de veces en que se mide la variable de estudio: Transversal, ya que se trabajara solo con las muestras obtenidas de ratas expuestas a EV o aceite de sésamo.

Según el tipo de variables de interés: Analítico, estudio comparativo que busca las diferencias de ratas de 60 días neonatales expuestas a EV con ratas normales de 60 días pertenecientes a un grupo control

Nivel de investigación: Relacional, se busca los efectos que produce la programación tisular temprana por medio de hormonas sexuales

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Ratas Albus Rattus
- Ratas pertenecientes a la cepa Sprague Dawley
- Peso normal
- Constantes vitales normales
- Ratas que hayan sido correctamente inyectadas.

Criterios de exclusión:

- Pérdida de peso mayor al 20%
- Aspecto enfermizo
- Respuesta agresiva o comatosa ante manipulación
- Cambio en la temperatura corporal mayor a 2°C e incremento del 50% en la frecuencia cardíaca

Determinación de variables:

Las variables dentro de una investigación serán las aristas más importantes para poder desarrollar el tipo de estudio comparativo y cuantitativo al que se desea llegar al final del estudio.

- Enfoque cuantitativo: Usa la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías [26].

El tipo de variable a desarrollar en esta investigación será de tipo cuantitativo, ya que se trata de un estudio con límites definidos y concretos [26] y de las cuales se obtendrán los datos finales para poder determinar la relación entre:

- Concentración final de D_1 : Estudio de tipo cuantitativo, ya que se realizará un conteo de receptores D_1 modificados por la administración hormonal sexual, expresando los datos finales mediante herramientas de conteo celular digital (Image J) y del campo estadístico.
- Concentración final de TH: Estudio cuantitativo de la concentración hormonal de TH, evaluando la concentración de este en base a los receptores D_1 , utilizando los mismos métodos estadísticos y de conteo digital anteriormente aplicados.

Se debe tener en cuenta también, que para ser calificadas como variables cuantitativas se basa en que al final de este proyecto de investigación los resultados serán recolectados en datos numéricos, provenientes de los fenómenos observables y cuantificables, que luego serán estudiados y analizados mediante procedimientos estadísticos [26].

Este tipo de enfoque cuantitativo nos ofrece la posibilidad de generalizar los resultados más ampliamente, y en rangos delimitados, como también nos otorga control sobre los fenómenos, así como un punto de vista de conteo y las magnitudes de estos. Asimismo, nos brinda una gran posibilidad de réplica y un enfoque sobre puntos específicos de tales fenómenos, además de que facilita la comparación entre estudios similares, haciendo revisión de literatura anterior, en la cual se basa el marco teórico [26].

Relevancia Teórica

La reprogramación de ratas neonatales con hormonas esteroideas y sus efectos en la función reproductiva en la vida adulta, ya ha sido estudiada y realizada. Sin embargo los estudios que abarquen el sistema dopaminérgico aún no han sido realizados.

Relevancia práctica

Tras una revisión de la literatura, no se encuentran métodos alternativos al procedimiento propuesto o que se obtenga el mismo resultado, además, dentro del proyecto en general, es la primera vez que se realiza una inmunofluorescencia para el análisis de esta vía.

La utilización de la inmunofluorescencia con tinción DAPI se usa para la tinción de ADN -tinción nuclear-, para la tinción de células vivas y para la contratinción en tinciones inmunofluorescentes de material humano y botánico, por lo tanto, ayudará a la identificación y ubicación de los receptores D₁ y TH modificados después de la administración de hormonas sexuales y pasados los 60 PND, para así lograr saber realmente si existe alguna alteración en relación a la vía dopaminérgica. Esto sumado a un procesamiento y análisis digital de las imágenes obtenidas a partir de los cortes histológicos permitirá obtener un análisis cuantitativo -basado en una escala de medición de grises- de las señales verdaderamente positivas correspondientes a los receptores D₁ y TH.

Relevancia final

La etapa neonatal es una etapa del desarrollo muy sensible a factores externos, que pueden afectar la expresión y funcionamiento de proteínas involucradas con la neurotransmisión dopaminérgica. Por lo tanto esta etapa es una ventana con un alto nivel de modificaciones debido a las posibles programaciones que puede sufrir el tejido. De manera que el estudiar los efectos producidos por la exposición a hormonas sexuales sobre el funcionamiento de circuitos dopaminérgicos en ratas adultas, puede llegar a ser fundamental para comprender el mecanismo del desarrollo de adicciones, por lo tanto, su observación ante la administración de hormonas es relevante para la recaudación de información que aporte para entender la fisiología de los seres humanos en un futuro y entregar una perspectiva nueva en cuanto a los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de adicciones.

Referencias.

1. Nestler EJ. Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience. New York: McGraw-Hill; 2015.
2. Silva R, Espinoza P, Riquelme R, Sanguinetti N, González L, Cruz G, et al. ROL DE LAS HORMONAS SEXUALES SOBRE CIRCUITOS DOPAMINÉRGICOS CEREBRALES. Sociedad de Farmacología de Chile [Internet]. [cited 2018Dec6]; Available from: <http://www.sofarchi.cl/2014-volumen-7-numero-1/>
3. Sotomayor-Zarate R, Cruz G, Renard G, Espinosa P, Ramirez V. Sex Hormones and Brain Dopamine Functions. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry. 2015;14(2):62–71.
4. Daubner SC, Le T, Wang S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2011;508(1):1–12.
5. Patiño Nicandro Mendoza. Farmacología médica. Editorial Médica Panamericana; 2008.
6. Guyton AC, Hall JE, Guyton AC. Tratado de fisiología médica: novena edición. McGraw-Hill/Interamericana de España; 1996.
7. Nieuwenhuys R, Voogd J, Huijzen Cvan. The human central nervous system. Berlin: Springer; 2008.
8. Pinto JM, Castillo RL, Sotomayor-Zárate R. Sex Hormones: Role in Neurodegenerative Diseases and Addiction. Sex Hormones in Neurodegenerative Processes and Diseases. 2018Feb.
9. Sotomayor-Zarate R, Cruz G, Renard G, Espinosa P, Ramirez V. Sex Hormones and Brain Dopamine Functions. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry. 2015;14(2):62–71.
10. Brooks, R.V.; Androgens. Clin. Endocrinol. Metab., 1975, 4, 503- 520.
11. Abdelgadir, S.E.; Roselli, C.E.; Choate, J.V.; Resko, J.A.; Distribution of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in adult rhesus monkey brains. Biol. Reprod., 1997, 57, 772- 777.
12. Stanic, D.; Dubois, S.; Chua, H.K.; Tonge, B.; Rinehart, N.; Horne, M.K.; Boon.W.C. Characterization of Aromatase Expression in the Adult Male and Female Mouse Brain. I. Coexistence with Oestrogen Receptors alpha and beta, and Androgen Receptors. PLoS One. 2014, 9, e90451.
13. Wagner, C.K.; Morrell, J.I. Distribution and steroid hormone regulation of aromatase mRNA expression in the forebrain of adult male and female rats: a cellular-level analysis using in situ hybridization. J. Comp. Neurol., 1996, 370, 71-84.
14. Kuiper, G.G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Haggblad. J.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 1997, 138, 863-870.
15. Laflamme, N.; Nappi, R.E.; Drolet, G.; Labrie, C.; Rivest, S. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. J Neurobiol.1998, 36, 357-378.
16. Kamei, Y.; Xu, L.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Kurokawa, R.; Gloss, B.; Lin, S.C.; Heyman, R.A.; Rose, D.W.; Glass, C.K.; Rosenfeld, M.G. A CBP integrator complex mediates

- transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 1996, 85, 403-414.
17. Sotomayor-Zárate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara HE. Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development–modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat. *Fertility and Sterility*. 2011;96(6):1490–6. /vol. 46, no. 5, pp. 322–327; 2014/ G. Cruz, R. Riquelme, P. Espinosa et al..
 18. R. Sotomayor-Zarate, M. Dorfman, A. Paredes, and H. E. Lara, “Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat,” *Biology of Reproduction*, vol. 78, no. 4, pp. 673–680, 2008.
 19. . A. Barraclough, “Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate,” *Endocrinology*, vol. 68, no. 1, pp. 62–67, 1961
 20. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. Amsterdam ;Boston: Elsevier Academic Press. 2005.
 21. Centola GM. Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy. *J anat*. 1978;127:553–61.
 22. Torrens Y, Beaujouan J-C, Besson M-J, 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. *European Journal of Pharmacology*. 1981;71(4):383–92.
 23. Espinosa P, Silva RA, Sanguinetti NK, Venegas FC, Riquelme R, González LF, et al. Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats. *Neural Plasticity*. 2016;2016:1–11.
 24. Moroney, G. (2017). Use of Aperio Image Analysis in Peer-Reviewed Breast Cancer Research. *Advancing Cancer Diagnostic Systems Improving Lives*.
 25. Underwood W. *AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition*. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.; 2013.
 26. Sampieri Roberto Hernández, Paulina MTC. *Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. McGraw-Hill Education; 2018.