



FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA INTEGRATIVA

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE ESTRADIOL VALERATO Y
TESTOSTERONA PROPIONATO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE RGS9-2 Y PKC β 2 EN
NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DE NÚCLEO ACCUMBENS DE RATAS ADULTAS DE
AMBOS SEXOS”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

ERICH OTTO MÜLLER RIVERA

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

Co-director de Tesis: **Dr. Jonathan Martínez**

2019

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al financiamiento otorgado por el **PROYECTO FONDECYT N° 1160398** del **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**. También se agradece al **Dr. Jonathan Martínez** de la Universidad de Valparaíso por toda su enseñanza y ayuda en las técnicas de laboratorio.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1) INTRODUCCIÓN	8
1.1) Circuito de la Recompensa	8
1.2) Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales	9
1.2.1) Estrógenos y Efectos sobre Circuitos Dopaminérgicos Cerebrales	10
1.2.2) Concepto de Reprogramación Neonatal por Hormonas Sexuales	12
1.3) Proteínas Reguladoras de la Señalización de Proteínas G	14
1.4) Proteína Kinsasa C beta -2 y su relación con DAT	14
2) HIPÓTESIS	16
3) OBJETIVOS	17
3.1) Objetivo General:	17
3.2) Objetivo Específico:	17
4) MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1) Drogas y Reactivos	18
4.2) Animales	18
4.3) Administración de EV, TP y Aceite de Sésamo	18
4.4) Registro de Peso	19
4.5) Registro de la Etapa del Ciclo Estral	19

4.6) Eutanasia de Animales y Extracción de Órganos.....	20
4.7) RT-qPCR	20
4.7.1) Extracción de ARN total	20
4.7.2) Cuantificación de ARN total	20
4.7.3) Integridad de ARN total	21
4.7.4) Transcripción reversa.....	21
4.7.5) Partidores	21
4.7.6) PCR en Tiempo Real	22
4.8) Análisis Estadístico	23
5) RESULTADOS	24
5.1) Efectos de la administración neonatal de hormonas sexuales sobre parámetros fisiológicos globales como peso corporal, ciclicidad estral y órganos reproductivos	24
5.1.1) Caracterización del Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal: Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva	24
5.1.2) Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Hembra Adultas	25
5.1.3) Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Macho Adultas	26
5.1.4) Efecto de la administración neonatal de EV sobre la Ciclicidad Estral de Ratas Hembra Adultas	27

5.2) Efectos de la administración neonatal de hormonas sexuales sobre la expresión de RGS9-2 y PKC β 2	28
5.2.1) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de <i>Rgs9-2</i> en NAcc de Ratas Adultas de ambos sexos	28
5.2.2) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de <i>Rgs9-2</i> en VTA de Ratas Adultas de ambos sexos	29
5.2.3) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de <i>Pkcβ2</i> en NAcc de Ratas Adultas de ambos sexos	30
5.2.4) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de <i>Pkcβ2</i> en VTA de Ratas Adultas de ambos sexos	31
6) DISCUSIÓN.....	32
6.1) Caracterización del modelo de estrogenización y androgenización neonatal: Curvas de crecimiento y parámetros de función reproductiva.....	32
6.2) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre la expresión de RGS9-2 en NAcc y VTA de Ratas Adultas de ambos sexos.....	33
6.3) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre la expresión de PKC β 2 en NAcc y VTA de Ratas Adultas de ambos sexos.....	35
7) CONCLUSIONES	37
8) BIBLIOGRAFÍA.....	38

RESUMEN

En esta tesis se estudiaron los efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre la modulación de la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la señalización dopaminérgica. Por un lado, las proteínas Reguladoras de la Señalización de Proteína G (RGS), modulan de manera activa la transducción de señales mediadas por receptores acoplados a proteína G. Dentro de esta familia RGS, la isoforma RGS9-2 inactiva la transducción de señales del receptor D2 de dopamina (D_2) y se expresa marcadamente en NAcc, un área crítica para las conductas recompensantes inducidas por reforzantes naturales y por las drogas de abuso. Por otra parte, la Proteína Kinasa Beta 2 ($PKC\beta_2$), una proteína intracelular clave en la actividad del transportador de dopamina (DAT) ha demostrado potenciar el eflujo de dopamina (DA) inducido por drogas psicoestimulantes como la anfetamina. El propósito de este estudio fue evaluar mediante RT-qPCR si la reprogramación neonatal con Estradiol Valerato (EV) o Testosterona Propionato (TP) afecta la expresión del ARNm de *Rgs9-2* y *Pkc\beta_2* en NAcc y Área Tegmental Ventral (VTA) de ratas adultas de ambos sexos. Los resultados muestran que la expresión del mensajero de *Rgs9-2* y *Pkc\beta_2* aumenta en NAcc y VTA de ratas hembras adultas tratadas con TP, mientras que en ratas machos no se evidencian cambios significativos en ninguna de las condiciones estudiadas. Estos resultados sugieren que la exposición neonatal a TP modifica la expresión génica de RGS9-2 y $PKC\beta_2$ en ratas hembras adultas, lo que debe ser corroborado mediante la determinación de los niveles proteicos de RGS9-2 y $PKC\beta_2$ para poder atribuir los cambios al efecto directo de EV o TP.

ABSTRACT

This thesis studied the effects of neonatal reprogramming with sex hormones on the modulation of the expression of proteins involved in the dopaminergic signaling. On the one hand, Regulators of G Protein Signalling (RGS), are GTPase accelerator proteins (GAP) that actively modulate the G protein-coupled receptors (GPCR) signaling pathways. Inside this RGS family, the alternative splicing form, RGS9-2, inhibits the signaling transduction of the D₂ dopamine receptor (D₂), and it is overly expressed in the Nucleus Accumbens (NAcc), a critic area for the rewarding behaviors that are induced by natural enhancers and drugs of abuse. On the other hand, Protein Kinase Beta 2 (PKC β 2), an intracellular protein that is key in the Dopamine Transporter (DAT) activity, has demonstrated to enhance dopamine efflux induced by psychostimulant drugs such as amphetamine. The purpose of this study was to evaluate if the neonatal reprogramming with Estradiol Valerate (EV) or Testosterone Propionate (TP) affects the mRNA of *Rgs9-2* and *Pkc β 2* in the NAcc or the Ventral Tegmental Area (VTA) of adult rats of both sexes, through RT-qPCR. Results show that the mRNA of either *Rgs9-2* and *Pkc β 2* increases in NAcc and VTA of female rats treated with TP, while in male rats no significant changes are evident in any of the studied conditions. These results suggest that the neonatal exposure to TP modifies the genetic expression of RGS9-2 and PKC β 2 in female rats, which it must be corroborated through Western blot by determination of the protein levels of RGS9 and PKC β 2 to attribute the changes to the direct effect of EV or TP.

1) INTRODUCCIÓN

El desarrollo de esta tesis estuvo focalizado en la comprensión de factores de vulnerabilidad que pueden afectar la respuesta a drogas de abuso y predisponer a individuos a la adicción. Por este motivo se desarrolló con especial atención en esta introducción conceptos claves como dopamina (DA), circuito de la recompensa, transportador de dopamina (DAT), proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (RGS), proteína quinasa C beta 2 (PKC β 2) y la forma en que las hormonas sexuales modulan la expresión de estas dos últimas.

1.1) Circuito de la Recompensa

La dopamina (DA) es un neurotransmisor catecolaminérgico sintetizado en neuronas dopaminérgicas. Estas neuronas se localizan en el Núcleo Arcuato del Hipotálamo (Origen del Sistema tuberoinfundibular), en la Sustancia Nigra *pars compacta* (SN: Origen del Sistema Nigroestriatal) y en el Área Tegmental Ventral (VTA: Origen del Sistema Mesocorticolímbico) [1], las cuales constituyen las principales vías dopaminérgicas cerebrales.

El Sistema Mesocorticolímbico o Circuito de la Recompensa está formado neuroanatómicamente por el VTA, el Núcleo Accumbens (NAcc) y regiones de la Corteza Prefrontal (CPF), las cuales son áreas cerebrales responsables del placer provocado frente a recompensantes naturales, como el sexo [2] y la comida [3], entre otros.

A nivel neuroquímico, este efecto placentero o recompensante se debe a la despolarización de las neuronas dopaminérgicas del VTA, las que liberan DA en sus proyecciones eferentes hacia NAcc (neuronas mesolímbicas) y CPF (neuronas mesocorticales) [4, 5] (ver figura 1).

Estas neuronas dopaminérgicas están reguladas por interneuronas GABAérgicas del VTA que mantienen inhibidas a las neuronas dopaminérgicas y que frente a un estímulo recompensante disminuyen su actividad [6, 7].

Figura 1

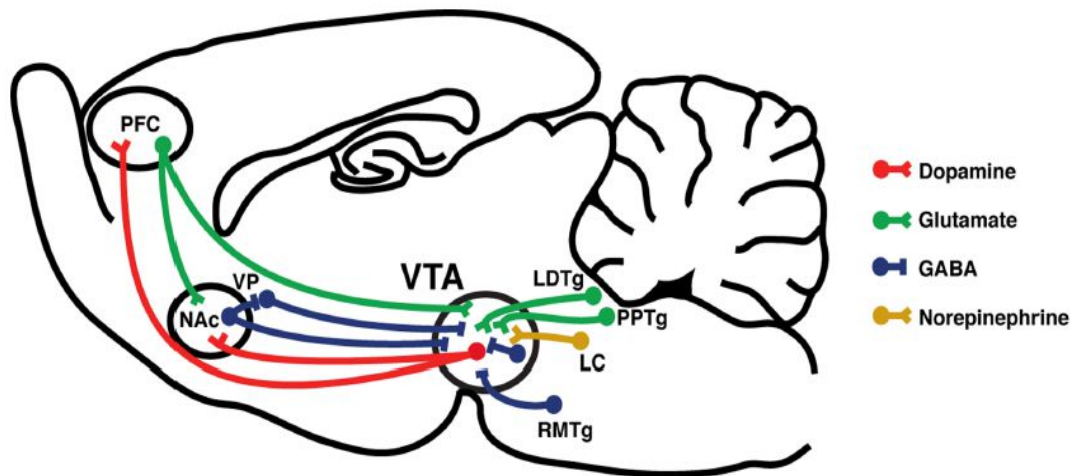


Figura adaptada de [8]. Circuito Mesocorticolímbico en Cerebro de Rata. **Abreviaturas:** PFC, corteza prefrontal; NAc, Núcleo Accumbens; VP, palido ventral; VTA, área tegmental ventral; LDTg, tegmento laterodorsal; PPTg, núcleo pedunculopontino tegmental; LC, locus coeruleus; RMTg, núcleo rostromedial tegmental.

1.2) Hormonas Sexuales y Efectos Cerebrales

Las hormonas sexuales son producidas por las gónadas y ejercen su acción en tejidos reproductivos femeninos (mama, útero y ovarios), masculinos (testículos y epidídimo) y tejidos no reproductivos (hígado, hueso, músculo, vasculatura y cerebro) [9]. Estas hormonas se caracterizan por ser derivadas del colesterol y por poseer una alta lipofiliidad, lo que les permite cruzar membranas biológicas como la barrera hematoencefálica y ejercer

sus efectos principales a través de receptores citoplasmáticos expresados tanto en tejidos periféricos como a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) [10, 11].

1.2.1) Estrógenos y Efectos sobre Circuitos Dopaminérgicos Cerebrales

En la familia de los estrógenos se encuentran el estradiol (E_2), la estrona y el estriol, sin embargo, el principal estrógeno producido por la gónada femenina es el E_2 [12]. Los receptores citoplasmáticos para el E_2 y estrógenos que han sido identificados son dos y se les denomina con las letras griegas α y β ($ER\alpha$ y $ER\beta$). El $ER\alpha$ y $ER\beta$ pertenecen a la clasificación de receptores nucleares y son miembros de la superfamilia de receptores de factores de transcripción Esteroides/Tiroides [13], y a nivel del SNC se localizan en diversas áreas cerebrales [11], incluyendo el circuito mesolímbico (VTA y NAcc) y nigroestriatal (SN y CS) [14-16]. Diversos estudios han demostrado que los estrógenos pueden afectar la expresión de proteínas involucradas en la regulación del sistema dopaminérgico, como la Tirosina Hidroxilasa (TH: proteína clave en la síntesis de DA). Así por ejemplo, se ha observado en ratas hembra ovariectomizadas (OVX), una disminución del número de neuronas TH positivas en SN y VTA [17], que es restituido al administrar agentes estrogénicos como E_2 (agonista no selectivo de $ER\alpha$ y $ER\beta$), diarilpropionitrilo (agonista selectivo de $ER\beta$) y propil-pirazol-triol (agonista selectivo de $ER\alpha$) [17]. También se ha demostrado que los estrógenos pueden modular los niveles de otras proteínas claves para la regulación dopaminérgica como el transportador de dopamina (DAT) y la proteína reguladora 9 de la señalización de proteína G (RGS9). En este sentido, mediante la

administración de E₂ en ratas OVX se ha observado una disminución selectiva de la expresión del ARNm de *Rgs9* en NAcc [18].

Además, se ha evidenciado una disminución significativa de los niveles de DAT en NAcc, en un periodo 4 a 5 semanas posteriores a la ovariectomía (OVX) y una restauración a sus niveles normales luego de un reemplazo con E₂ [19]. Por otro lado, la expresión estriatal de DAT en ratas adultas OVX se encuentra disminuida y el reemplazo con E₂, diarilpropionitrilo (DPN: agonista selectivo de Erβ) y tamoxifeno (modulador selectivo del receptor de estrógeno) incrementa la expresión de DAT en CE [20].

Respecto a los receptores dopaminérgicos se ha observado que los niveles del receptor tipo 2 de DA (D₂) están significativamente aumentados en NAcc y CE de ratas OVX, mientras que el reemplazo hormonal con E₂ reduce los niveles de D₂ a niveles de ratas controles [19]. Estudios de hibridación *in situ* han demostrado que luego de 14 días de tratamiento con E₂ se reduce la expresión de ARNm de D₂ en CE y NAcc, sin afectar la expresión de los subtipos 1 (D₁) y 3 (D₃) en las mismas regiones cerebrales [21]. Al contrario, y dependiendo de la región cerebral, se ha observado que en ratas OVX tratadas con E₂ incrementa la expresión del ARNm de D₁, D₂ y D₃ en PFC y del ARNm de DAT en VTA [22]. Finalmente, la señalización dopaminérgica a través de los receptores D₁ y D₂ en NAcc y CE es también modulada por hormonas sexuales. Así, por ejemplo, estudios de autoradiografía han demostrado que la administración repetida de cocaína en ratas OVX tratadas con E₂ reduce la activación del D₂ en CE y NAcc. Lo que significa que los cambios funcionales en los receptores dopaminérgicos en presencia de cocaína son regulados por estradiol [23].

Con respecto a testosterona, se ha evidenciado que la administración de cocaína en machos castrados produce un aumento significativo en la locomoción en comparación con machos control, demostrando así que posee un importante rol en neuronas dopaminérgicas y en conductas inducidas por drogas de abuso [24]. En resumen, estas evidencias indican que las hormonas sexuales juegan un rol importante en la regulación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, a través de la modulación neuroquímica y neuroplástica de proteínas claves.

1.2.2) Concepto de Reprogramación Neonatal por Hormonas Sexuales

El concepto de reprogramación es definido como la redirección fisiológica de un tejido u órgano por efecto de un estímulo o daño en un período sensible del desarrollo fetal o postnatal temprano (neonatal), que provoca cambios funcionales a largo plazo [25]. 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.

Se ha observado que a nivel del sistema reproductivo la exposición neonatal a compuestos con actividad estrogénica produce alteraciones en el funcionamiento de las gónadas, afectando la fertilidad en humanos y animales [26]. En la década de los 60 se demostró que la exposición neonatal a testosterona en el día postnatal 5 (DPN 5) en ratas hembra induce en la adultez una condición anovulatoria acompañada de la formación de quistes ováricos [27, 28].

En nuestro país, el grupo del Dr. Hernán Lara demostró en el año 2011 que la administración neonatal de una sola dosis de estradiol valerato (EV) o testosterona propionato (TP), produce en ratas hembra adultas alteraciones reproductivas y neuroquímicas a nivel del hipotálamo ventromedial [29]. Recientemente nuestro laboratorio, utilizando el mismo modelo experimental ha demostrado que la administración neonatal de EV aumenta el contenido de catecolaminas a nivel de circuitos cerebrales relacionados con locomoción y recompensa tanto en ratas hembra [30] y macho [31] adultas. Interesantemente, este modelo no sólo ha demostrado un aumento en el contenido de DA en neuronas del VTA, que es dependiente de un aumento de la expresión de la enzima TH, sino también frente a un estímulo depolarizante se observa que estas neuronas liberan más DA en NAcc [31] (véase figura 2).

Figura 2

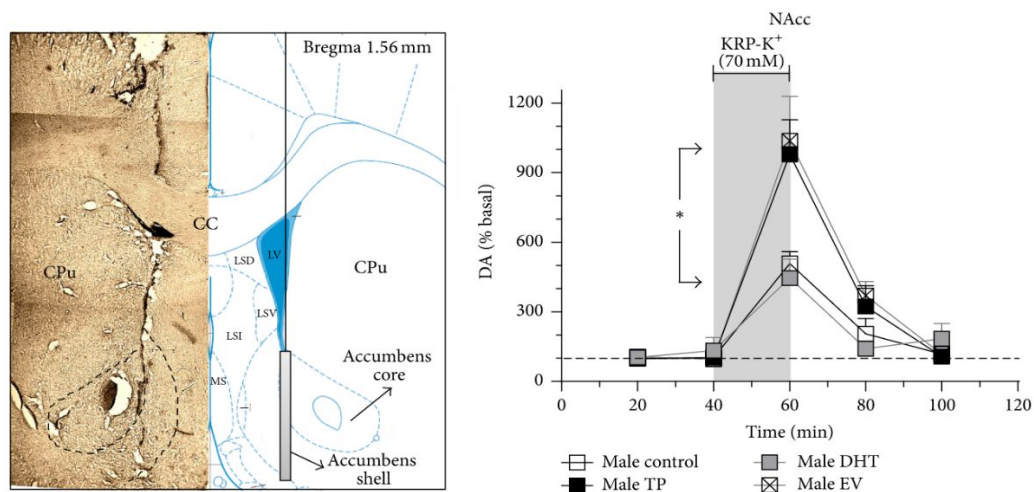


Figura tomada de [31]. El panel de la izquierda muestra una microfotografía con la localización de la cánula de microdiálisis en NAcc, mientras que el panel de la derecha muestra la liberación de DA inducida por un estímulo depolarizante en NAcc. En este último caso se puede observar que ratas tratadas con EV y TP liberan más DA que ratas control o tratadas con Dihidrotestosterona (DHT).

1.3) Proteínas Regulatoras de la Señalización de Proteínas G

Las proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (RGS) son una familia de proteínas que funcionan como proteínas aceleradoras de la GTPasa (GAP), aumentando así la velocidad a la que el GTP se disocia a GDP desde la subunidad α de la proteína G e inactivando la transducción de señales[18]. Por tanto, las proteínas RGS modulan de manera activa prácticamente todos los eventos involucrados en la cascada de señalización intracelular, después de la estimulación de una variedad de receptores metabotrópicos, incluidos los dopaminérgicos.

Dentro de esta familia, la isoforma *RGS9-2* se expresa de forma marcada en neuronas dopaminérgicas de NAcc [18], (un área crítica para las conductas de recompensa); y funciona como una proteína GAP con afinidad por los receptores acoplados a proteína Gi/Go [32]. En particular *RGS9-2* ha mostrado regular la cascada de señalización río abajo del receptor D2 de dopamina (D2R) y de los receptores μ -opioides (MOR), y ha sido implicado en la adicción a drogas y desordenes de movimiento[32].

1.4) Proteína Kinsasa C beta -2 y su relación con DAT

Mediante la técnica de inmunoprecipitación, se demostró que las isoenzimas de PKC β potencian el eflujo de dopamina de DAT inducido por anfetamina, ya que PKC β 1 y PKC β 2 co-inmunoprecipitan con DAT. Además, se demostró que el eflujo de dopamina fue mucho mayor en un cultivo celular transfectado con la isozima PKC β 2. Por tanto, PKC β 2 estaría asociado físicamente a DAT y sería la responsable de este efecto [33]. Cabe destacar que drogas psicoestimulantes como la anfetamina regulan la fosforilación de

proteínas de membrana (ingresa a través del DAT y se une a TAAR1, reduciendo así la tasa de disparo neuronal)[34], lo cual es mediado por la activación de PKC β 2, siendo este uno de los principales reguladores de la activación del DAT [34].

Tomando en conjunto las evidencias presentadas en esta introducción, que establecen el periodo neonatal como una ventana crítica de sensibilidad a los efectos de las hormonas sexuales, y que la exposición a estas puede generar efectos a largo plazo sobre el desarrollo y funcionamiento cerebral, surge como tema de investigación el determinar si la exposición neonatal a hormonas sexuales afecta la expresión génica de *Rgs9* y *Pkc β 2* en la neurotransmisión dopaminérgica del circuito de la recompensa mediada por DAT, D₁ y D₂.

2) HIPÓTESIS

En vista de los antecedentes antes mencionados, la hipótesis de esta tesis es:

“La exposición neonatal a estradiol valerato y a testosterona propionato disminuye la expresión de RGS9-2 y PKC β 2, en neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de ratas adultas de ambos sexos”.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo General:

Estudiar los efectos de la reprogramación neonatal con hormonas sexuales sobre la expresión del ARNm de *Rgs9-2* y *Pkcβ2*, en NAcc y VTA de ratas Sprague Dawley adultas de ambos sexos.

3.2) Objetivo Específico:

Determinar los niveles de ARNm de *Rgs9-2* y *Pkcβ2* en NAcc y VTA de ratas adultas de ambos sexos que fueron expuestas durante las primeras horas postnatales a una dosis de EV, TP o Aceite de Sésamo (control) a través de RT-qPCR.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1) Drogas y Reactivos

El Estradiol Valerato (EV), Testosterona Propionato (TP) y Aceite de Sésamo fueron adquiridos de Sigma & Aldrich Chile S.A.

4.2) Animales

Se utilizaron crías de ratas Sprague Dawley de ambos sexos recién nacidas. Todos los animales fueron alojados en la sala de mantención de animales del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso a una temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad ($55 \% \pm 5 \%$) controlada, bajo ciclos luz-oscuridad (12:12 horas) encendiendo las luces a las 08:00 am. Los animales fueron destetados al día postnatal (DPN) 21, siendo agrupados por sexo y desde esta fecha y hasta el final de los experimentos (DPN 60) fueron mantenidos con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales planteados en esta 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 esta tesis, se hicieron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

4.3) Administración de EV, TP y Aceite de Sésamo

Diferentes camadas de ratas Sprague Dawley fueron repartidas aleatoriamente por sexo y grupo experimental (control, EV y TP). Cada animal fue inyectado por vía subcutánea (s.c.) con una dosis única durante las primeras 12 horas postnatales de EV (0,1 mg de EV disueltos en 50 μL de aceite de sésamo s.c.), TP (1 mg de TP disueltos en 50 μL de aceite de sésamo

s.c.), o Aceite de Sésamo (Control: 50 µL de aceite de sésamo s.c.). Cabe señalar que las dosis de EV y TP han sido previamente usadas con éxito y aceptadas en publicaciones previas [35].

4.4) Registro de Peso

Se llevó un registro diario del peso (excluyendo fines de semana y feriados) de los grupos control y EV desde el DPN 1 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.

4.5) Registro de la Etapa del Ciclo Estral

Para las ratas hembra de los grupos control y EV, se registraron las etapas del ciclo estral desde el DPN 40 hasta el DPN 60-62. La fecha de apertura vaginal se registró en las ratas hembra de ambos grupos experimentales, como una medida de inicio de la pubertad [36]. El ciclo estral fue evaluado mediante el análisis de lavados vaginales diarios con un microscopio de luz, comparando las características citológicas que adopta el epitelio vaginal por efecto de los niveles circulantes de hormonas sexuales esteroideas y que caracterizan a las etapas periovulatorias [37]:

- 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 sólo 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.

4.6) Eutanasia de Animales y Extracción de Órganos

Una vez llegado el DPN60, los animales fueron anestesiados con isoflurano USP y eutanasiados por decapitación con guillotina para animales menores (Modelo 51330, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) al DPN 60-62 para realizar la extracción de los tejidos sensibles al efecto hormonal en ratas adultas. En ratas hembras se extrajeron los ovarios, útero e hipófisis, mientras que en ratas machos se extrajeron los testículos, vesícula seminal e hipófisis. Todos los tejidos fueron pesados en una balanza analítica (Modelo JK-180, Chyo, Japón) y registrados para cada animal.

4.7) RT-qPCR

4.7.1) Extracción de ARN total: El ARN total fue extraído de cada una de las áreas cerebrales microdisectadas, utilizando el kit NucleoSpin® ARN (Catálogo N°740955.50, Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total obtenido fue luego almacenado a -80°C hasta su uso posterior.

4.7.2) Cuantificación de ARN total: El ARN total fue cuantificado en un espectrofotómetro Epoch (BioTek™ Instruments Inc., EEUU) a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Se trabajó con las muestras que presentaron una relación Absorbancia 260/280 nm entre 1,8-2,0 para sus análisis correspondientes.

4.7.3) Integridad de ARN total: La verificación de la integridad del ARN total extraído se realizó a través de un gel de agarosa al 1% p/v, teñido con el reactivo Maestro *Safe Nucleic Acid Prestained* como agente intercalante. Las muestras fueron sometidas a denaturación, incubándolas a 70°C por 15 minutos en conjunto con buffer de carga para ácidos nucleicos (NEB, cat N°B7025S), para luego cargarlas en el gel de agarosa, realizar la electroforesis a 100 Volts durante 60 min y observar el gel en un transiluminador.

4.7.4) Transcripción reversa: La síntesis de ADNc y la reacción de PCR se llevó a cabo usando un termociclador convencional. Se utilizaron entre 1 y 150 ng de RNA total por muestra, los que fueron sometidos a transcripción reversa usando el Kit de Transcripción Reversa RevertAid RT kit (N° de Catálogo K1691, Thermofisher, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El ADNc obtenido fue almacenado a -80°C hasta su utilización.

4.7.5) Partidores: Los partidores a utilizar para *Rgs9-2* y *Pkcβ2* fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-BLAST de NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a partir de las secuencias de ARNm publicados en GenBank (NCBI). Mediante esta misma herramienta se determinó la especificidad de amplificación de los partidores. Para el análisis del nivel de expresión de los genes *Rgs9-2* y *Pkcβ2* se normalizaron los datos utilizando el gen constitutivo *18S ribosomal* como referencia. Las secuencias de los partidores del gen de referencia fueron obtenidas de Ramón Sotomayor-Zárate *et al.*, 2008. Las secuencias de los genes se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de partidores utilizados en esta tesis (Pb= pares de bases).

Gen	Secuencia	Tamaño (pb)
<i>Pkcβ2</i> (NM_002738.7)	Fw: ATT GCC CCA GAG ATC ATT GC	20
	Rev: CGA AGT TTT CAG CGT TTC GC	20
<i>Rgs9-2</i> (NM_002738.7)	Fw: CCT GAC AGC AGC CTC TAT CG	20
	Rev: TTC ATT CCA GGA GGG CTT CG	20
<i>18S</i> (NR_003286.4)	Fw: TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG	20
	Rev: GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA	20

4.7.6) PCR en Tiempo Real: La PCR en Tiempo Real se llevó a cabo utilizando el reactivo Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Catalog #600828; Agilent Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El volumen de reacción total fue de 10 µL. Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando un equipo de PCR en Tiempo Real AriaMX (Agilent Technologies). La denaturación inicial del templado fue realizada por 10 min a 95°C. El protocolo de amplificación consistió en denaturación por 10 s a 95°C, hibridación por 20 s a 60° para *Rgs9-2*, 15 s a 55° para *18s* y 10s a 55° para *Pkcβ2*; y extensión por 30 s a 72°C, durante 40 ciclos. Para determinar la eficiencia de cada condición de PCR se utilizó una curva de calibrado elaborada con diluciones seriadas de un pool de muestras de NAcc y VTA para *Rgs9-2*, *Pkcβ2* y *18S*. La especificidad de los amplicones resultantes se confirmó mediante el análisis de las curvas de melting generadas al finalizar la reacción. En cada determinación experimental se añadió un control sin templado (reacción sin ADNc) como control negativo. Se realizó el método cuantificación relativa usando *18S* como control endógeno, y los resultados fueron expresados como veces de cambio mediante el método de $2e^{-\Delta\Delta CT}$ [38].

4.8) Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (EEM). Las diferencias entre los grupos control y tratamiento fueron analizadas mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una y dos vías. La diferencia estadísticamente significativa se consideró cuando el valor de p fue menor a 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

5) RESULTADOS

5.1) Efectos de la administración neonatal de hormonas sexuales sobre parámetros fisiológicos globales como peso corporal, ciclicidad estral y órganos reproductivos

5.1.1) Caracterización del Modelo de Estrogenización y Androgenización Neonatal:

Curvas de Peso y Parámetros de Función Reproductiva

A los animales de las series experimentales se les registró sus pesos corporales para establecer que todos los grupos de animales tuviesen curvas de crecimiento que mostraran sus ganancias de peso. En este sentido, ambos grupos de ratas, tanto tratadas como control de ambos sexos, mostraron una ganancia de peso similar a la observada previamente en otras series experimentales de nuestro laboratorio (Gráfico 1).

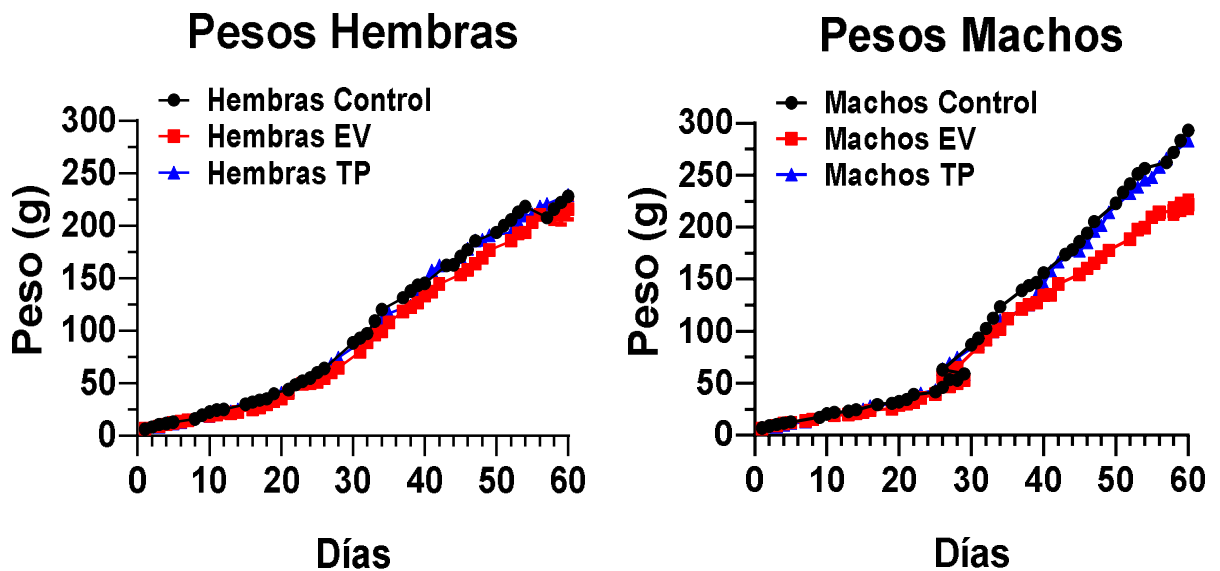


Gráfico 1.

Curvas de Peso de Ratas Hembras y Ratas Macho utilizadas en esta tesis. Los datos fueron expresados como el promedio \pm EEM. Se utilizaron 6 ($n=6$) ratas hembras y machos tanto para los grupos control como para los grupos EV y TP.

5.1.2) Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratitas Hembra

Adultas

La administración neonatal de las hormonas sexuales (EV y TP) produjo una reducción del tamaño de las gónadas de las hembras (Ovario Izquierdo: OI; Ovario Derecho: OD) utilizadas en esta tesis. La reducción del tamaño de las gónadas en las hembras adultas es un control positivo de la administración neonatal de hormonas sexuales que hemos observado previamente en otras series experimentales de nuestro laboratorio [30].

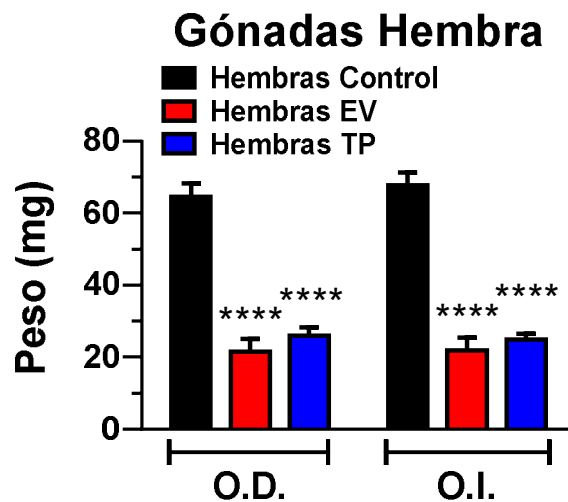


Gráfico 2.

Pesos del tamaño de los ovarios derechos (OD) y ovarios izquierdos (OI) de ratas hembra control (OD: 64.6 ± 3.7 mg ; OI: 67.8 ± 3.5 mg), ratas EV (OD: 21.6 ± 3.6 mg ; OI: 21.9 ± 3.6 mg) y ratas TP (OD: 25.9 ± 2.4 mg ; OI: 25.0 ± 1.6 mg) adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales. Los datos fueron expresados como el promedio \pm EEM y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls post-test. (**** $P < 0.0001$).

5.1.3) Peso de Tejidos Sensibles a la Acción de Hormonas Sexuales en Ratas Macho

Adultas

Al igual que en las ratas hembra, la administración neonatal de las hormonas sexuales (EV y TP) produjo una reducción del tamaño de las gónadas de ratas macho (Testículo Izquierdo: T.I.; Testículo Derecho: T.D.) utilizadas en esta tesis. La reducción del tamaño de las gónadas en los machos adultos es un control positivo de la administración neonatal de hormonas sexuales que hemos observado previamente en otras series experimentales de nuestro laboratorio [31].

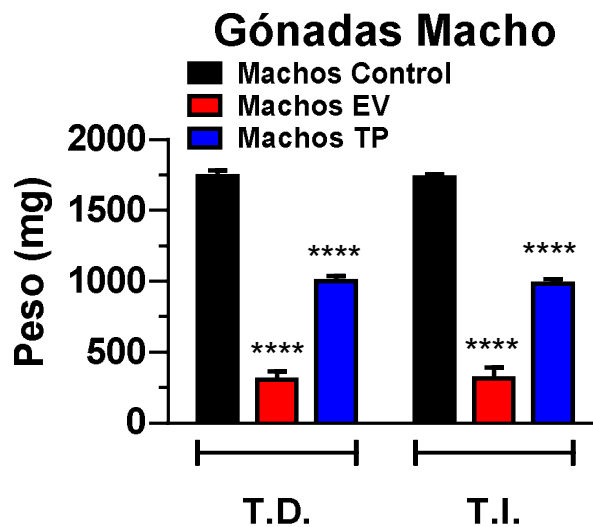


Gráfico 3.

Pesos del tamaño de los testículos derechos (T.D.) y testículos izquierdos (T.I.) de ratas macho control (TD: 1742.0 ± 40.145 mg ; TI: 1730.6 ± 27.1 mg), ratas EV (TD: 305.3 ± 59.1 mg ; TI: 315.9 ± 75.6 mg) y ratas TP (TD: 1000.5 ± 37.9 mg ; TI: 982.9 ± 32.5 mg) adultas expuestas durante las primeras horas de vida postnatal a hormonas sexuales. Los datos fueron expresados como el promedio ± EEM y el análisis estadístico utilizado fue ANOVA de una vía seguido de Newman-Keuls post-test (****P<0.0001).

5.1.4) Efecto de la administración neonatal de EV sobre la Ciclicidad Estral de Ratras Hembra Adultas

Otro control interno que se utiliza en nuestro laboratorio para verificar que la administración neonatal de EV fue efectiva, es medir la ciclicidad estral de las ratas. Al igual que lo observado en esta tesis, antecedentes en la literatura han demostrado que las ratas tratadas con EV presentan una aciclicidad estral producida principalmente por una disminución del tamaño de las gónadas y de las estructuras responsables de promover los ciclos estrales [30, 35]. Cabe señalar, que a ratas hembras tratadas con TP no se pudo realizar frotis vaginales, ya que estas ratas presentan una agénesis que impide tomar muestras para determinar el ciclo estral.

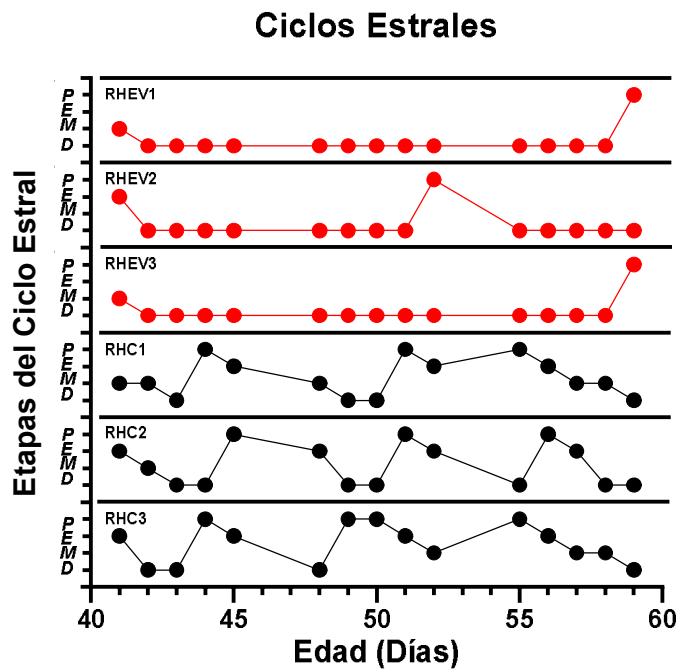


Gráfico 4. Ciclos Estrales representativos de las ratas utilizadas en esta tesis. Comparación entre ratas hembra controles (puntos y líneas negras) versus ratas hembra EV (puntos y líneas rojas).

5.2) Efectos de la administración neonatal de hormonas sexuales sobre la expresión de RGS9-2 y PKC β 2

5.2.1) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de *Rgs9-2* en NAcc de Ratas Adultas de ambos sexos

Los niveles de ARNm de *Rgs9-2* en NAcc determinados mediante RT-qPCR, muestran que en ratas hembras tratadas con TP aumenta significativamente la expresión del ARNm de *Rgs9-2* en comparación con los grupos control y EV al DPN 60 (Gráfico 5A), mientras que en ratas macho no se observaron cambios estadísticamente significativos (Gráfico 5B).

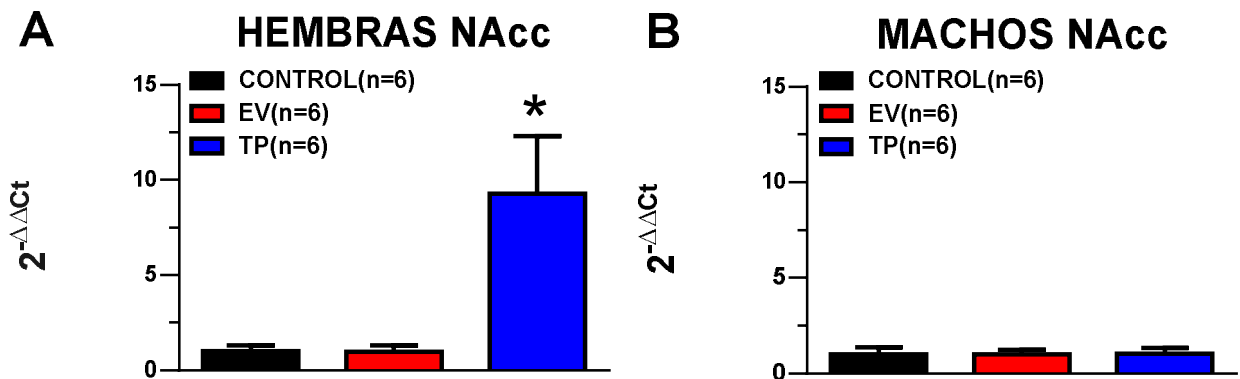


Gráfico 5.

Efecto de la administración neonatal de EV o TP sobre la expresión génica de *Rgs9-2* en NAcc de ratas adultas de ambos sexos. Los datos son expresados como el promedio \pm EEM. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía (* $P < 0,05$).

5.2.2) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de *Rgs9-2* en VTA de Ratas Adultas de ambos sexos

Los niveles de ARNm de *Rgs9-2* en VTA determinados mediante RT-qPCR, muestran que en ratas hembra tratadas con TP, aumenta significativamente la expresión del ARNm de *Rgs9-2* en comparación con los grupos control y EV al DPN 60 (Gráfico 6A), mientras que en ratas macho no se observaron cambios estadísticamente significativos (Gráfico 6B).

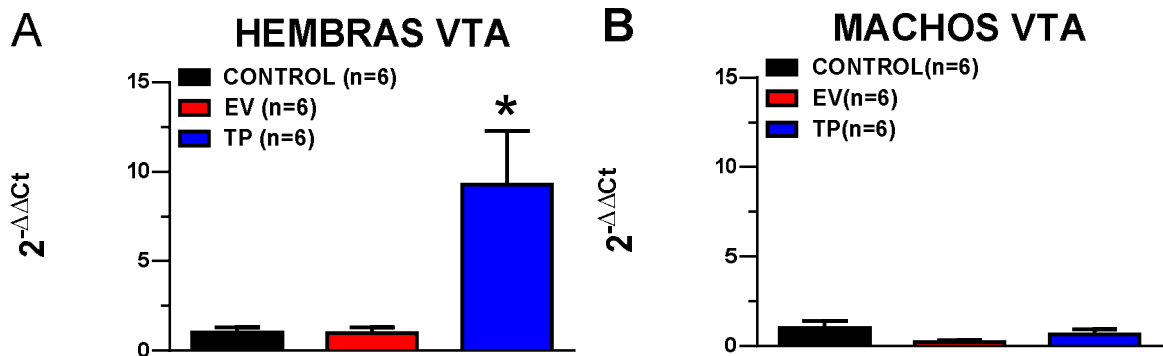


Gráfico 6.

Efecto de la administración neonatal de EV o TP sobre la expresión génica de *Rgs9-2* en VTA de ratas adultas de ambos sexos. Los datos son expresados como el promedio \pm EEM. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía (* $P < 0,05$).

5.2.3) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de *Pkcβ2* en NAcc de Ratas Adultas de ambos sexos

Los niveles de ARNm de *Pkcβ2* en NAcc determinados mediante RT-qPCR, muestran que en ratas hembra tratadas con TP aumenta significativamente la expresión del ARNm de *Pkcβ2* con respecto al grupo control y EV al DPN60 (Gráfico 7A), mientras que en ratas macho no se observan cambios estadísticamente significativos (Gráfico 7B).

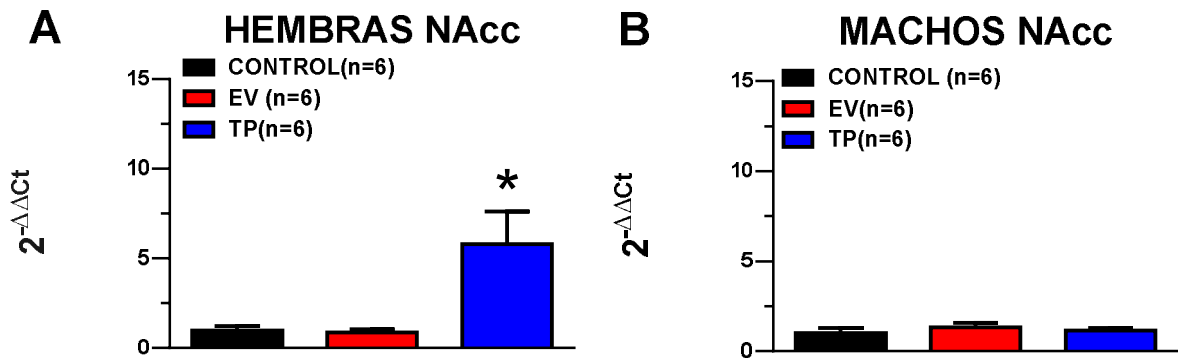


Gráfico 7.

Efecto de la administración neonatal de EV o TP sobre la expresión génica de *Pkcβ2* en VTA de ratas adultas de ambos sexos. Los datos son expresados como el promedio ± EEM. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía (*P<0,05).

5.2.4) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre los niveles de ARNm de *Pkcβ2* en VTA de Ratas Adultas de ambos sexos

Los niveles de ARNm de *Pkcβ2* en NAcc determinados mediante RT-qPCR, muestran que en ratas hembra tratadas con TP aumenta significativamente la expresión del ARNm de *Pkcβ2* con respecto al grupo control y EV al DPN60 (Gráfico 8A), mientras que en ratas macho no se observan cambios estadísticamente significativos (Gráfico 8B).

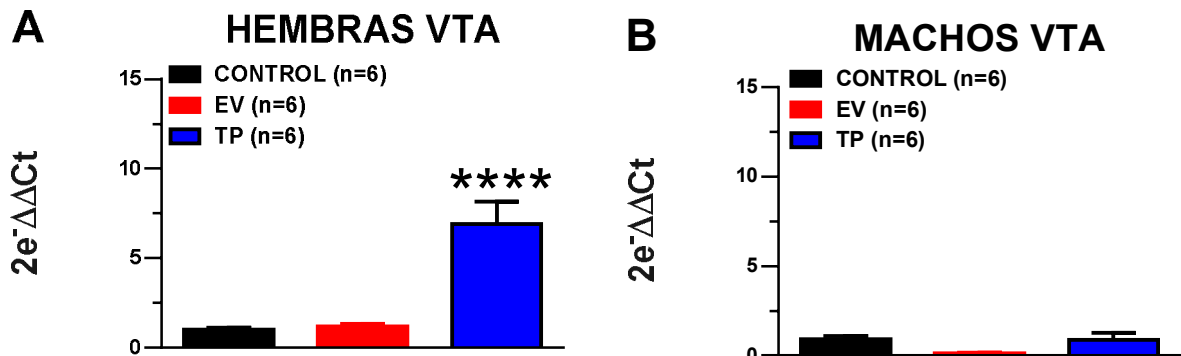


Gráfico 8.

Efecto de la administración neonatal de EV o TP sobre la expresión génica de *Pkcβ2* en VTA de ratas adultas de ambos sexos. Los datos son expresados como el promedio ± EEM. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía (****P<0,0001).

6) DISCUSIÓN

6.1) Caracterización del modelo de estrogenización y androgenización neonatal: Curvas de crecimiento y parámetros de función reproductiva.

Los resultados obtenidos muestran que los animales tratados con EV y los machos tratados con TP al DPN1, presentan una disminución significativa de peso en comparación a sus respectivos grupos control cuando son adultos (Gráfico 1). De acuerdo con esto, es posible que la administración neonatal de EV o TP al DPN1 afecte receptores específicos a nivel hipotalámico e hipofisiario. Lo que modificaría el desarrollo de otros ejes endocrinos involucrados en la regulación del crecimiento, como las hormonas tiroideas y los factores de crecimiento, entre otros.

Por otra parte, resultados previos obtenidos en el laboratorio demostraron que la exposición a hormonas sexuales al DPN1 produce efectos a largo plazo en tejidos sensibles a la acción de estas hormonas. Por ejemplo, la administración neonatal de EV, TP y DHT produce una hipoactivación del eje HPG en ratas hembras al DPN60, lo que se traduce en una disminución significativa del tamaño de los ovarios al compararlos con el grupo control (Gráfico 2). De acuerdo con esto y al igual que en publicaciones previas (Sotomayor-Zárate *et al.*, 2008), se observó que la desregulación del eje HPG producida por la administración neonatal de EV puede generar alteraciones en la ciclicidad estral (Gráfico 4). Funcionalmente, esto se relaciona a alteraciones reproductivas tales como anovulación, ausencia de cuerpos lúteos y niveles bajos de progesterona séricos (Sotomayor-Zárate *et al.*, 2008, Cruz *et al.*, 2014), por lo que la medición de estos parámetros confirma la correcta

administración neonatal de las hormonas sexuales. En cuanto a las ratas macho, al DPN60 se observa que la administración neonatal de EV y TP produce una reducción significativa del tamaño de los testículos (Gráfico 3), esto se relaciona a una disminución de los niveles plasmáticos de testosterona, por lo que la medición de este parámetro en ratas macho al igual que en ratas hembras comprueba la efectividad de la correcta administración de las hormonas al DPN1.

6.2) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre la expresión de RGS9-2 en NAcc y VTA de Ratas Adultas de ambos sexos.

Según los resultados obtenidos en esta tesis, los niveles de ARNm de *Rgs9-2* tanto en NAcc como VTA de ratas hembra adultas, solo se vieron afectados por la administración neonatal de TP. Mientras que en ratas macho no se observaron cambios estadísticamente significativos con respecto a la serie control (Gráficos 5 y 6). El aumento de la expresión génica de *Rgs9-2* implicaría una menor activación de los receptores D₂ y con esto un efecto menos pronunciado en presencia de drogas de abuso, dado que aumentaría la inactivación de la transducción de señales mediadas por D₂R y con esto disminuiría la señalización de dopamina [39] (véase Figura 3).

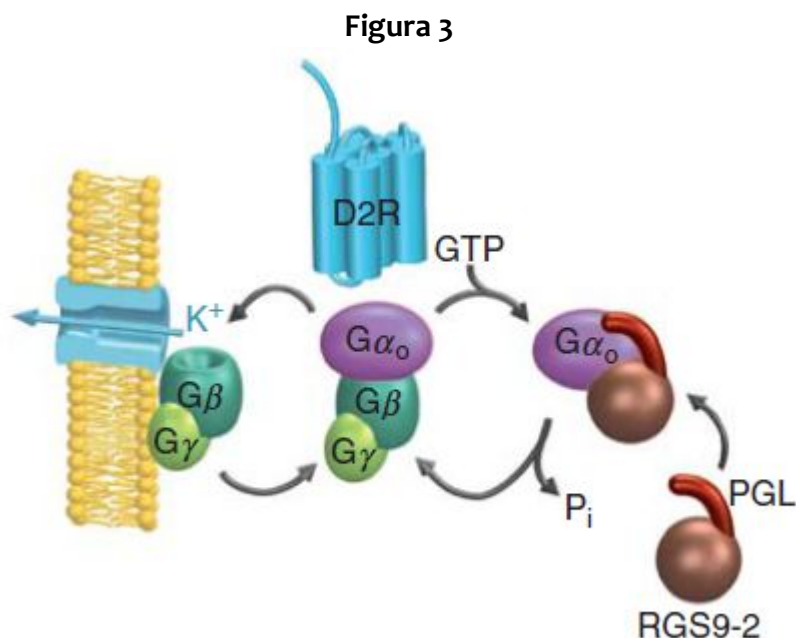


Figura adaptada de [40]. Rol de RGS9-2 en la regulación de la vía de señalización de las Proteínas Gi/o de neuronas estriatales. Abreviaturas: D2R, receptor D2 dopaminérgico; GTP, guanosin trifosfato; PGL, fosfodiesterasa gamma like; RGS9-2, regulador de señalización de proteína G 9-2.

En relación con la serie control, se ha observado que el estradiol disminuye los niveles de ARNm de *Rgs9-2* al cabo de 10 a 14 días en NAcc y VTA de ratas OVX luego de su administración única. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de ARNm de *Rgs9-2* en presencia de estradiol. Al parecer estos cambios descritos en literatura no se traducen en cambios sostenibles en el tiempo, ya que al administrar EV al DPN 1, los niveles de estradiol estarán elevados no más de 10-12 días [41]. Entonces si los estudios se realizan al DPN 60 no se pueden atribuir los cambios al efecto directo de EV o TP. Por lo que quizás ocurren cambios postraduccionales que reviertan esta situación, así aumentando la expresión de RGS9-2 al cabo de 60 días.

Es por esto por lo que habría que complementar estos resultados con una técnica analítica como Western-blot que permita cuantificar los niveles de proteína de RGS9-2 para determinar si la administración neonatal de una dosis única de EV o TP afecta efectivamente su expresión.

6.3) Efecto de la administración neonatal de EV y TP sobre la expresión de PKC β 2 en NAcc y VTA de Ratas Adultas de ambos sexos.

En cuanto a *PKC β 2*, sus niveles de ARNm aumentaron tanto en NAcc como VTA de ratas hembra adultas, y al igual que con *Rgs9-2*, solo se vieron afectados por la administración neonatal de TP. Mientras que en ratas machos no se observaron cambios estadísticamente significativos con respecto a la serie control (Gráficos 7 y 8).

El aumento de la expresión génica de PKC β 2 implicaría un aumento de la fosforilación del DAT y por tanto una mayor activación. Lo que conlleva a una disminución del Vmax (capacidad) del transporte de dopamina, mayor eflujo de dopamina e internalización del DAT [42]. Cada uno de estos efectos se traduciría en un aumento de los niveles extracelulares de dopamina. Así, en presencia de psicoestimulantes como anfetamina, aumentaría el eflujo de dopamina a través del DAT, (véase Figura 4), potenciando de esta manera sus efectos sobre el circuito de la recompensa y alterando la capacidad del DAT para realizar el clearance de dopamina. Por otro lado, se recomienda contar con los datos de la expresión de DAT para saber si este está siendo fosforilado por PKC β 2 y así tener una visión más detallada de lo que ocurre río abajo de los receptores en neuronas dopaminérgicas tanto de NAcc como de VTA. Se sugiere utilizar la técnica de Westernblot,

utilizando un anticuerpo específico para DAT fosforilado, y correlacionar esta fosforilación con los niveles de PKC β 2.

Figura 4

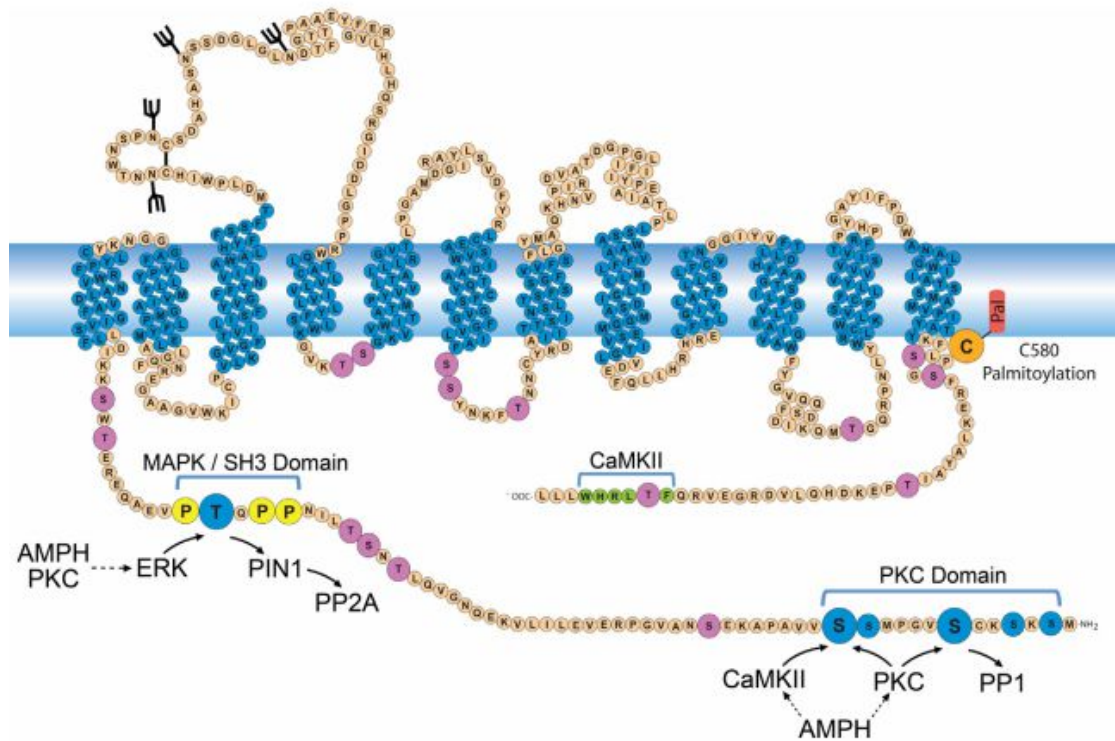


Figura adaptada de [42]. Vía de Fosforilación del DAT en presencia de anfetamina. En la figura se aprecia el DAT como proteína integral expresada en la membrana plasmática de una neurona dopaminérgica (en azul); y los sitios de fosforilación de PKC y MAPK (MAPK/SH₃ Domain y PKC Domain). Abreviaturas: PKC, proteína quinasa C; AMPH, anfetamina.

En cuanto a las ratas macho, estas no mostraron cambios significativos en los niveles de ARNm en ninguna de las condiciones estudiadas.

7) CONCLUSIONES

- La reprogramación neonatal con TP aumenta la expresión del mensajero de *Rgs9-2* y *Pkcβ2* en ratas hembra adultas.
- La administración neonatal de EV o TP no altera la expresión del mensajero de *Rgs9-2* o *Pkcβ2* en NAcc ni VTA de ratas macho adultas.

8) BIBLIOGRAFÍA

1. Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(1): p. 189-225.
2. Pfaus, J.G., et al., *Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat*. *Brain Res*, 1990. **530**(2): p. 345-8.
3. Bassareo, V. and G. Di Chiara, *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**(2): p. 851-61.
4. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurocircuitry of addiction*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(1): p. 217-238.
5. Kalivas, P.W. and N.D. Volkow, *The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice*. *Am J Psychiatry*, 2005. **162**(8): p. 1403-13.
6. Gysling, K. and R.Y. Wang, *Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat*. *Brain Res*, 1983. **277**(1): p. 119-27.
7. Johnson, S.W. and R.A. North, *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. *J Neurosci*, 1992. **12**(2): p. 483-8.
8. Morikawa, H. and C.A. Paladini, *Dynamic regulation of midbrain dopamine neuron activity: intrinsic, synaptic, and plasticity mechanisms*. *Neuroscience*, 2011. **198**: p. 95-111.
9. Wierman, M.E., *Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action*. *Adv Physiol Educ*, 2007. **31**(1): p. 23-33.
10. Belcher, S.M. and A. Zsarnovszky, *Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **299**(2): p. 408-14.
11. McEwen, B., *Estrogen actions throughout the brain*. *Recent Prog Horm Res*, 2002. **57**: p. 357-84.
12. Wierman, M.E., *Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action*. *Adv Physiol Educ*, 2007. **31**(1): p. 26-33.
13. Dahlman-Wright, K., et al., *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 773-81.
14. Becker, J.B., *Sexual differentiation of motivation: a novel mechanism?* *Horm Behav*, 2009. **55**(5): p. 646-54.
15. Becker, J.B. and M. Hu, *Sex differences in drug abuse*. *Front Neuroendocrinol*, 2008. **29**(1): p. 36-47.
16. Creutz, L.M. and M.F. Kritzer, *Mesostriatal and mesolimbic projections of midbrain neurons immunoreactive for estrogen receptor beta or androgen receptors in rats*. *J Comp Neurol*, 2004. **476**(4): p. 348-62.
17. Johnson, M.L., et al., *Oestrogen receptors enhance dopamine neurone survival in rat midbrain*. *J Neuroendocrinol*, 2010. **22**(4): p. 226-37.
18. Sharifi, J.L., D.L. Brady, and J.I. Koenig, *Estrogen modulates RGS9 expression in the nucleus accumbens*. *Neuroreport*, 2004. **15**(15): p. 2433-6.
19. Chavez, C., et al., *The effect of estrogen on dopamine and serotonin receptor and transporter levels in the brain: an autoradiography study*. *Brain Res*, 2010. **1321**: p. 51-9.
20. Morissette, M. and T. Di Paolo, *Effect of chronic estradiol and progesterone treatments of ovariectomized rats on brain dopamine uptake sites*. *J Neurochem*, 1993. **60**(5): p. 1876-83.

21. Lammers, C.H., et al., *Regulation of striatal dopamine receptors by estrogen*. Synapse, 1999. **34**(3): p. 222-7.
22. Sarvari, M., et al., *Estradiol and isotype-selective estrogen receptor agonists modulate the mesocortical dopaminergic system in gonadectomized female rats*. Brain Res, 2014. **1583**: p. 1-11.
23. Febo, M., et al., *Estrogen-dependent alterations in D2/D3-induced G protein activation in cocaine-sensitized female rats*. J Neurochem, 2003. **86**(2): p. 405-12.
24. Menendez, E., et al., *[Glucose tolerance and plasma testosterone concentrations in men. Results of the Asturias Study]*. Endocrinol Nutr, 2011. **58**(1): p. 3-8.
25. Lucas, A., *Programming by early nutrition in man*. Ciba Found Symp, 1991. **156**: p. 38-50; discussion 50-5.
26. Davies, M.J. and R.J. Norman, *Programming and reproductive functioning*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(9): p. 386-92.
27. Barraclough, C.A., *Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate*. Endocrinology, 1961. **68**: p. 62-7.
28. Gorski, R.A., *Influence of age on the response to parnatal administration of a low dose of androgen*. Endocrinology, 1968. **82**(5): p. 1001-4.
29. Sotomayor-Zarate, R., et al., *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**(6): p. 1490-6.
30. Cruz, G., et al., *Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat*. Horm Metab Res, 2014. **46**(5): p. 322-7.
31. Espinosa, P., et al., *Programming of Dopaminergic Neurons by Neonatal Sex Hormone Exposure: Effects on Dopamine Content and Tyrosine Hydroxylase Expression in Adult Male Rats*. Neural Plast, 2016. **2016**: p. 4569785.
32. Masuho, I., K. Xie, and K.A. Martemyanov, *Macromolecular composition dictates receptor and G protein selectivity of regulator of G protein signaling (RGS) 7 and 9-2 protein complexes in living cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(35): p. 25129-42.
33. O'Malley, H.A., et al., *PKCbeta co-localizes with the dopamine transporter in mesencephalic neurons*. Neurosci Lett, 2010. **480**(1): p. 40-3.
34. Johnson, L.A., et al., *Regulation of amphetamine-stimulated dopamine efflux by protein kinase C beta*. J Biol Chem, 2005. **280**(12): p. 10914-9.
35. Sotomayor-Zarate, R., et al., *Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat*. Biol Reprod, 2008. **78**(4): p. 673-80.
36. Ojeda, S.R., J.P. Advis, and W.W. Andrews, *Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat*. Fed Proc, 1980. **39**(7): p. 2365-71.
37. Centola, G.M., *Surface features of exfoliated vaginal epithelial cells during the oestrous cycle of the rat examined by scanning electron microscopy*. J Anat, 1978. **127**(Pt 3): p. 553-61.
38. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
39. Rahman, Z., et al., *RGS9 modulates dopamine signaling in the basal ganglia*. Neuron, 2003. **38**(6): p. 941-52.
40. Martemyanov, K.A. and V.Y. Arshavsky, *Biology and functions of the RGS9 isoforms*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2009. **86**: p. 205-27.

41. Martinez-Pinto, J., et al., *Neonatal exposure to estradiol valerate reprograms the rat ovary androgen receptor and anti-Mullerian hormone to a polycystic ovary phenotype*. *Reprod Toxicol*, 2018. **75**: p. 127-135.
42. Foster, J.D. and R.A. Vaughan, *Phosphorylation mechanisms in dopamine transporter regulation*. *J Chem Neuroanat*, 2017. **83-84**: p. 10-18.