



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

TESINA DE GRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**CONTRIBUCIÓN DEL SEXO EN LA RESPUESTA
LOCOMOTORA Y EN LA ESPINOGENÉISIS EN
NEURONAS HIPOCAMPALES ASOCIADAS A LA
ADMINISTRACIÓN DE ANFETAMINA**

Julieta Agustina Cetra Zarate

Directora: Dra. María Mercedes Benedetto

Co-directora: Dra. María Julia Cambiasso

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra



I N I M E C

Año 2023

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

**CONTRIBUCIÓN DEL SEXO EN LA RESPUESTA LOCOMOTORA Y EN LA
ESPINOGÉNESIS EN NEURONAS HIPOCAMPALES ASOCIADAS A LA
ADMINISTRACIÓN DE ANFETAMINA**

Alumno/a: Julieta Agostina Cettra-Zarate

Director/a: Dra. María Mercedes Benedetto

Co-director/a: Dra. María Julia Cambiasso

Tribunal Examinador

- Nombre y Apellido: Dra. María Angélica Rivarola
Firma:

- Nombre y Apellido: Dra. Carla Daniela Cisternas
Firma:

- Nombre y Apellido: Dr. Agustín Anastasia
Firma:

- Calificación:

- Fecha:

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Córdoba, por ser pública, libre y gratuita, por brindarnos educación de calidad y permitirnos a muchos de nosotros ser los primeros estudiantes universitarios de nuestras familias.
- A la Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales por ser nuestra casa de estudios durante estos años.
- Al Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, lugar donde además de brindarme todo lo necesario para realizar la tesis, me permitió conocer el mundo de la ciencia a partir de sus seminarios, charlas y jornadas.
- A CONICET y FONCYT por el financiamiento para llevar a cabo este proyecto.
- A la comisión evaluadora de esta tesis: Dra. Carla Cisternas, Dra. María Angélica Rivarola y Dr. Agustín Anastasia.
- A mi directora, Dra. María Mercedes Benedetto, por acompañarme en este camino, tanto en lo académico como en lo personal, para finalizar mi carrera; por incentivar y motivarme siempre, aconsejarme, apoyarme, confiar en mí; por enseñarme tanto, trabajar codo a codo y por estar tan presente. Coqui, gracias por todo, sin vos este trayecto no hubiera sido el mismo.
- A mi co-directora, Dra. María Julia Cambiasso, por abrirme las puertas del laboratorio COSEX para realizar mi tesis, por su confianza y apoyo, además de toda la ayuda brindada.
- A la Dra. María Gabriela Paglini, por permitirme ser una más en su laboratorio y acompañarnos en todo para realizar este trabajo.
- Al equipo del laboratorio COSEX: Cami Sosa, Maca Villarreal, Ro Bigarani, Carla Cisternas, Sabri Sotto; por la compañía, el cariño, las charlas y las catarsis.
- Al equipo del laboratorio Paglini: Flor Dadam, Martín Basmadjian, Ana Rodríguez, Eli Marucci; siempre recibiendo con alegría en el laboratorio, enseñándome y ayudándome en todo. Las risas, los chistes y las cosas dulces nunca faltaron, gracias por la compañía y por hacer de este camino más lindo.
- A las amistades que me regaló la carrera, Bruno, José, Bel, Tin, Fran, Enzo, Mateo, Emi, Ceci, Mojo, Jujuy; sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta el final, gracias por acompañarme, entenderme y ser mis pilares durante todos estos años.

- A mis amistades de Villa María, que por suerte son tantas y me acompañaron en todo momento, gracias por escucharme y alentarme siempre, soy muy afortunada de tenerlos.
- Finalmente, a mi familia, a mi mamá Fory y mi papá Tati, que me dieron la oportunidad de estudiar la carrera que elegí, que me incentivaron y empujaron para seguir adelante cuando el camino se tornaba difícil, que me brindaron lo mejor durante esta etapa, este logro es tanto mío como suyo. A mis hermanas, Paula y Manuela, siempre esperándome los fines de semana para recargarme las energías, por festejar conmigo cada vez que rendía bien alguna materia, por ser tan tan compañeras.

INDICE

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 5 |
| 1.1 El cerebro: un órgano sexualmente dimórfico | 6 |
| 1.1.1 Rol de las hormonas sexuales en la diferenciación sexual del cerebro | 6 |
| 1.1.2 Rol de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual del cerebro | 9 |
| 1.2 Adicción a drogas de abuso | 10 |
| 1.2.1 Dopamina - Sistema Mesocorticolímbico - Circuito de recompensa | 10 |
| 1.2.2 Hipocampo | 11 |
| 1.2.3 Drogas psicoestimulantes | 14 |
| 1.2.4 Hormonas sexuales y adicción a drogas de abuso | 16 |
| 1.2.5 Sensibilización conductual | 16 |
| 1.3 Plasticidad sináptica y espinas dendríticas | 17 |
| 1.3.1 Elementos estructurales | 19 |
| 1.3.2 Clasificación morfológica | 20 |
| 1.3.3 Hormonas sexuales y espinas dendríticas hipocampales | 21 |
| OBJETIVO GENERAL | 23 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 2.1 Animales de experimentación | 25 |
| 2.2 Genotipificación | 25 |
| 2.2.1 Obtención de muestras | 25 |
| 2.2.2 Extracción y purificación del ADN genómico | 25 |
| 2.2.3 Determinación de la expresión de Thy-1 | 26 |
| 2.2.4 Electroforesis | 26 |
| 2.3 Protocolo de dos Inyecciones (PDI) | 26 |
| 2.4 Análisis conductual | 28 |
| 2.5 Procesamiento de muestras para Microscopia Confocal | 29 |
| 2.5.1 Perfusión | 29 |
| 2.5.2 Procesamiento del cerebro | 29 |
| 2.5.3 Microscopía confocal | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.6 Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas | 30 |
| 2.7 Análisis estadístico | 32 |
| RESULTADOS | 33 |
| 3.1 Sensibilización conductual asociada a la administración de anfetamina | 34 |
| 3.1.1 Actividad locomotora durante la habituación en Fase 1 | 34 |
| 3.1.2 Efecto agudo de anfetamina | 35 |
| 3.1.3 Sensibilización conductual en respuesta a la administración de anfetamina | 36 |
| 3.2 Diferencias sexuales en la densidad y morfogénesis de espinas dendríticas | 39 |
| 3.2.1 Densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales del área CA1 | 40 |
| 3.2.2 Morfología de espinas dendríticas de neuronas hipocampales del área CA1 | 41 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 43 |
| 4.1 La respuesta aguda a la administración de anfetamina es un mecanismo dependiente del sexo en ratones PN 21 | 44 |
| 4.2 La administración de anfetamina bajo un protocolo de dos inyecciones resulta en la sensibilización conductual de hembras PN 23 | 45 |
| 4.3 La espinogénesis de neuronas hipocampales del área CA1 es un proceso sexualmente dimórfico | 49 |
| 4.4 Los cambios en la morfogénesis de espinas dendríticas dependen del sexo y/o del tratamiento con anfetamina | 53 |
| 4.5 Conclusiones | 54 |
| BIBLIOGRAFÍA | 56 |

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Anf: Anfetamina

AR: Receptores de andrógenos

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CA: Cuerno de Amón

CPFr: Corteza Prefrontal

D2: Receptores dopaminérgicos presinápticos

DA: Dopamina

DAT: Transportador de dopamina

dh: Diámetro de la cabeza de la espina

DHT: Dihidrotestosterona

dn: Diámetro del cuello de espina dendrítica

E: Edad Embrionaria

E2: Estradiol

eGFP: Proteína verde fluorescente

ER: Receptores de estrógenos

EstD: Estriado Dorsal

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

i.p: Inyección intraperitoneal

L: Longitud de espina dendrítica

LTP: Potenciación a largo plazo

MAO: Monoamina oxidasa

NAc: Núcleo Accumbens

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PN: Posnatal

PSD: Densidad postsináptica

ROI: Región de interés

Sal: Solución salina (NaCl 0.9%)

SNC: Sistema nervioso central

T: Testosterona

TA: Temperatura ambiente

TH: Tirosina hidroxilasa

VMAT-2: Transportador vesicular de monoaminas tipo 2

VTA: Área Tegmental Ventral

RESUMEN

La adicción a drogas es una neuropatología que afecta tanto a mujeres como a hombres y, si bien este trastorno ha sido estudiado mayormente en hombres, la evidencia indica la existencia de diferencias sexuales en su etiología, epidemiología y progresión. Un fenómeno relacionado a la adicción es la sensibilización conductual, definida como un incremento progresivo y persistente de los efectos psicomotores de una droga como consecuencia de una exposición repetida a la misma. Las respuestas neuroadaptativas que subyacen a la adicción involucran procesos de plasticidad sináptica, siendo las espinas dendríticas el sitio donde reside dicho fenómeno. Se sabe también, que el proceso de plasticidad sináptica es regulado por esteroides sexuales. En función de esto nos propusimos evaluar si existen diferencias sexuales en la respuesta locomotora y en la espinogénesis hipocampal asociada a la exposición a anfetamina. Para ello, ratones machos y hembras de 21 días de edad fueron tratados con anfetamina o vehículo en un protocolo de dos inyecciones, el cual permite evaluar el efecto agudo de la droga y la sensibilización conductual. Cuatro horas después de la última exposición al tratamiento se obtuvieron muestras de cerebro para analizar la densidad y el tipo de espinas dendríticas en neuronas piramidales del área hipocampal CA1. El tratamiento agudo con la droga indujo mayor hiperlocomoción en hembras, efecto que también se observó en la sensibilización conductual. Además, se encontraron diferencias sexuales en la densidad de espinas dendríticas, la cual fue mayor en machos. El análisis morfológico reveló diferencias dependientes del sexo en las espinas tipo Stubby y dependientes del tratamiento en las Thin. Estos resultados revelan la existencia de diferencias sexuales a los efectos de anfetamina a nivel conductual y de plasticidad sináptica.

ABSTRACT

Drug addiction is a neuropathology that affects both women and men. Although this disorder has primarily been studied in men, evidence indicates the existence of sex differences in its etiology, epidemiology, and progression. A related phenomenon to addiction is behavioral sensitization, which is defined as a progressive and persistent increase in the psychomotor effects of a drug due to repeated exposure. The neuroadaptive responses that underlie addiction involve processes of synaptic plasticity, with dendritic spines being the site where this phenomenon resides, which is regulated by sex steroids. In this study, we aimed to evaluate potential sex differences in the locomotor response and hippocampal spinogenesis associated

with amphetamine exposure. For this purpose, 21-day-old male and female mice were injected with amphetamine or vehicle treatment in a two-injection protocol, allowing us to assess both the acute effects of the drug and behavioral sensitization. Four hours after the last exposure to the drug, brain samples were collected to analyze the density and morphology of dendritic spines in pyramidal neurons of the hippocampal area CA1. The results showed that acute treatment with the drug induced greater hyperlocomotion in females, an effect also observed in the context of behavioral sensitization. Additionally, sex differences were identified in the density of dendritic spines which was greater in males. The morphological analysis revealed sex-dependent differences in Stubby spines and treatment-dependent differences in Thin spines. These findings highlight the existence of sex differences in the effects of amphetamine at both behavioral and synaptic plasticity levels.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 El cerebro: un órgano sexualmente dimórfico

El cerebro de los mamíferos se caracteriza por ser un órgano sexualmente dimórfico en determinadas regiones a nivel de su estructura y función; lo que trae como consecuencia diferencias en las respuestas fisiológicas y/o comportamentales dirigidas por las mismas (Bao & Swaab, 2011; Pfaff & Christen, 2013). El sexo es una variable crucial que modula procesos neurobiológicos fundamentales que van desde las tasas de neurogénesis hasta la fisiología sináptica (Bao & Swaab, 2011; McCarthy et al., 2017; Pfaff & Christen, 2013). Estas diferencias sexuales derivan de un proceso complejo que se produce durante el desarrollo de los individuos, el cual se corresponde con la hipótesis unificada de diferenciación sexual del cerebro. La misma reconoce el rol fundamental de las hormonas sexuales, que ejercen un efecto organizador en el cerebro, modelando diferencialmente los circuitos neuronales durante el desarrollo gestacional y postnatal (PN) temprano; además incluye los efectos mediados por los genes ligados a los cromosomas X e Y, los cuales codifican información genética mayormente disímil (Arnold et al., 2016; Arnold, 2017; Cox & Rissman, 2011). Esta hipótesis, a su vez, destaca las interacciones antagónicas y sinérgicas de ambos factores (Arnold, 2019).

1.1.1 Rol de las hormonas sexuales en la diferenciación sexual del cerebro

Las hormonas esteroideas son una de las cuatro clases de hormonas secretadas por las glándulas endocrinas, las cuales se sintetizan a partir del colesterol (Figura 1), del cual se escinden los carbonos para generar dos grupos funcionalmente distintos de hormonas, las que median la respuesta al estrés (cortisol) y las **hormonas “esteroides sexuales”** (progestágenos, andrógenos y estrógenos) que regulan la función reproductiva. En los mamíferos, las hormonas progestacionales son la pregnenolona y la progesterona, las cuales son precursoras de las demás hormonas esteroideas (Frick et al., 2015).

Dentro de tejidos específicos, como en las gónadas o en el cerebro, se encuentran las enzimas necesarias para convertir la progesterona en andrógenos [testosterona (T), androstenediona y dihidrotestosterona (DHT)]. Los **andrógenos**, en mamíferos machos, son necesarios para diversas funciones como la espermatogénesis, el mantenimiento de los genitales y el desarrollo de las características sexuales secundarias y la masa muscular después de la pubertad, además, están involucrados en numerosos comportamientos que facilitan el éxito reproductivo (cortejo, cópula, agresión) (Nelson, 2011). Aunque las fuentes primarias de andrógenos en mamíferos machos son los testículos, el cerebro también genera una cantidad sustancial de hormonas esteroides sexuales independientemente de los testículos (Amateau et

al., 2004).

Los andrógenos son los precursores de todos los **estrógenos** [estradiol (E2), estrona, estriol]; mediante el proceso denominado aromatización, la enzima aromatasa escinde un carbono de los precursores androgénicos para formar los estrógenos (Breedlove & Hampson, 2002). En las hembras de los mamíferos, los estrógenos son esenciales para diversas funciones, incluidas las copulatorias y reproductivas como la estimulación de la ovulación, el desarrollo de características sexuales secundarias; entre otras. La fuente primaria de estrógenos en las hembras son los ovarios, que los sintetizan y liberan en respuesta a las señales de la gonadotropina, hormona liberada por la hipófisis. Además, los estrógenos actúan estimulando el comportamiento sexual y regulan la ovulación. Cabe destacar que esta hormona también se sintetiza en el cerebro (Rune & Frotscher, 2005).

Tanto machos como hembras sintetizan cantidades considerables de progestágenos, andrógenos y estrógenos, pero difieren en la cantidad de enzimas disponibles para metabolizarlas (Terasawa & Ojeda, 2009)).

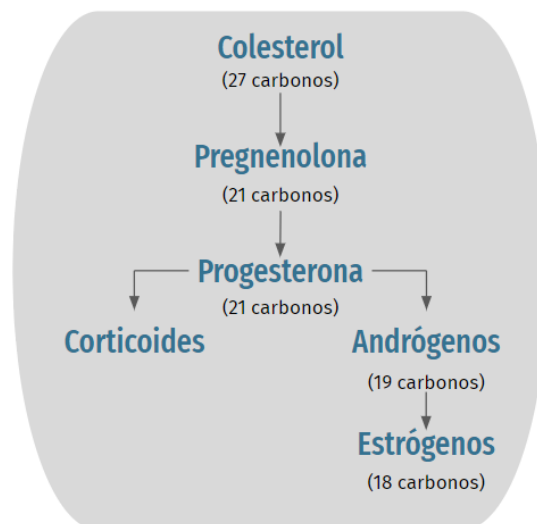


Figura 1. Esquema simplificado de la biosíntesis de hormonas esteroideas. El precursor, colesterol, se escinde para generar pregnenolona y progesterona. Estas hormonas son precursores esenciales para todas las demás hormonas esteroideas. La progesterona puede luego convertirse en otras hormonas, como los corticoides, o puede ser metabolizada para producir andrógenos. La enzima aromatasa escinde un carbono adicional de los andrógenos para producir estrógenos. Imagen adaptada de Frick et al. (2015).

A nivel del sistema nervioso central (SNC), los esteroides gonadales ejercen dos tipos de acciones, las organizacionales y las activacionales (Figura 2) (Vigil et al., 2016). Las **acciones organizacionales** describen los efectos de las hormonas gonadales en el modelado

sexualmente dimórfico de los circuitos neuronales, los cuales en roedores comienzan embrionariamente durante un período sensible perinatal (también llamado ventana crítica) con el inicio de la esteroidogénesis gonadal en machos de edad embrionaria (E) 15-17 y terminan dentro de las primeras dos semanas PN. Durante este periodo crítico los testículos fetales producen andrógenos que llegan al cerebro, se convierten en estrógenos e inician la masculinización del mismo; en paralelo, en esta etapa no hay esteroidogénesis en las hembras, dado que el ovario fetal femenino permanece inactivo (McCarthy et al., 2017). En conjunto, las acciones organizacionales determinan las diferencias sexuales tanto en la anatomía como en la fisiología neuronal (McCarthy et al., 2017; Nugent et al., 2011).

Por otro lado, las **acciones activacionales** se refieren a las respuestas fisiológicas/comportamentales del cerebro adulto sexualmente dimórfico frente a los esteroides sexuales (Vigil et al., 2016). De esta forma, la T producida por los testículos en desarrollo llega al cerebro y activamente “organiza” los circuitos cerebrales del tipo masculino, de modo tal que, en la adultez, estos circuitos responden a los efectos “activacionales” de las hormonas gonadales. En machos adultos, la T se mantiene en niveles altos y constantes, desarrollando comportamientos típicamente masculinos (monta, defensa territorial, entre otros). En hembras, por el contrario, la ausencia de secreciones gonadales durante este período conduce al desarrollo de un cerebro típicamente femenino. Durante la adultez, las hembras experimentan cambios cíclicos en los niveles hormonales de estrógenos y progesterona asociados con la ovulación, y es según esta variación hormonal que el cerebro será capaz de generar respuestas fisiológicas/comportamentales específicamente femeninas; como por ejemplo la lordosis (Arnold, 2009; McCarthy et al., 2017). Los efectos activacionales de las hormonas gonadales comienzan con el inicio de la pubertad el cual, en ratones, ocurre en el día PN 29; siendo la apertura vaginal el acontecimiento que marca dicho inicio (Kumar & Boehm, 2013).

Entre los períodos organizacionales y activacionales, se encuentra el **periodo de hiato juvenil**, que comienza poco después del nacimiento y se prolonga hasta la pubertad, el cual se caracteriza por niveles bajos o inexistentes de esteroides (McCarthy et al., 2017).

En conclusión, se puede afirmar que el medio esteroideal de cada sexo activa los circuitos neurales de diversos comportamientos los cuales fueron organizados durante el período perinatal (McCarthy et al., 2017).

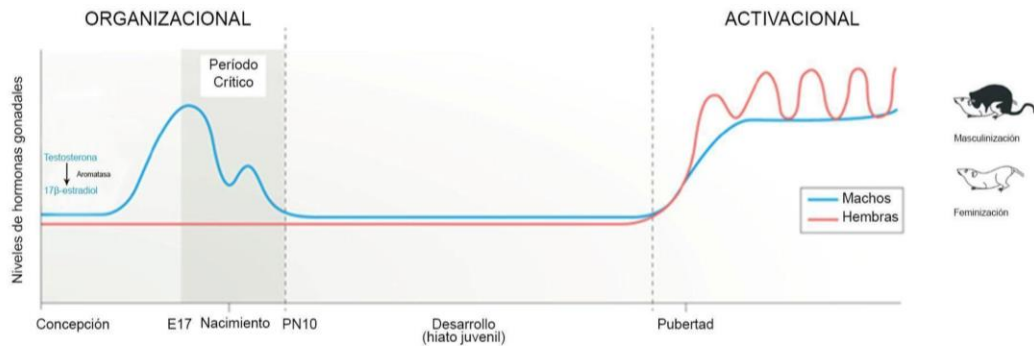


Figura 2. Acciones organizacionales y activacionales de las hormonas esteroideas sexuales. Las acciones organizacionales se dan durante el periodo crítico, cuando se inicia la esteroidogénesis gonadal en los machos a E17 y terminan dentro de las primeras dos semanas PN. Luego se observa un periodo de hiato juvenil en el que los niveles de esteroides son bajos o inexistentes. En la pubertad (PN 29) comienzan las acciones activacionales, donde los niveles de testosterona se mantienen altos y constantes en los machos, mientras que en las hembras se producen cambios en los niveles de estrógenos y progesteronas asociados al ciclo estral. Imagen adaptada de McCarthy et al. (2017).

1.1.2 Rol de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual del cerebro

Como se mencionó anteriormente, no todos los efectos hormonales en los adultos están predeterminados en el desarrollo, y no todas las diferencias sexuales se deben a la acción hormonal. Además de su influencia en la diferenciación gonadal y la producción de hormonas esteroideas, el **complemento cromosómico sexual** es una variable adicional que contribuye al desarrollo de diferencias sexuales cerebrales y comportamentales (McCarthy et al., 2017).

El concepto de **determinación sexual** hace referencia al proceso por el cual queda definido, en la embriogénesis temprana, el seguimiento de una vía de diferenciación sexual femenina o masculina, la cual está controlada directamente por el complemento cromosómico sexual del cigoto original (Mäkelä et al., 2019). En mamíferos, los complementos cromosómicos sexuales pueden ser *XX* (dos copias del cromosoma *X*, una heredada del padre y otra de la madre) o *XY* (una copia del cromosoma *X* heredada de la madre y una copia del cromosoma *Y* heredada del padre); donde los individuos *XX* quedan determinados como hembras y los *XY* como machos. Esta determinación ocurre fundamentalmente por la existencia exclusiva del gen *Sry* (“*Sex determining region Y*”, de sus siglas en inglés) en el cromosoma *Y*, el cual comienza a expresarse en la embriogénesis temprana (alrededor de E10.5 en ratón) en las células de las gónadas indiferenciadas de los individuos *XY*, iniciando así el proceso de diferenciación testicular. Por otro lado, en individuos *XX*, ciertos genes autosomales y otros

ligados al cromosoma X (presentes también en embriones XY pero silenciados por la acción del gen *Sry*), inducen el programa de diferenciación de los ovarios (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993).

1.2 Adicción a drogas de abuso

La adicción a las drogas se define como una neuropatología crónica del cerebro que se caracteriza por la búsqueda y el uso compulsivo de estupefacientes, provocando consecuencias nocivas en el organismo (Kreek, 2001; Liu & Li, 2018; Nestler, 2001). La misma es ampliamente reconocida como una enfermedad recurrente que afecta tanto a mujeres como a hombres (Fattore et al., 2008) y, si bien esta afección fue estudiada mayormente en hombres, existen evidencias que revelan la existencia de importantes diferencias dependientes del sexo en la misma (Fattore et al., 2008). Las bases neurobiológicas de las diferencias sexuales en el proceso de adicción incluyen la activación del sistema de recompensa, influenciada por interacciones entre los cambios en el nivel de hormonas gonadales, las diferencias en la actividad de los circuitos de recompensa dopaminérgicos y las modificaciones epigenéticas de genes clave que están involucrados en la función del sistema de recompensa (Santos-Toscano et al., 2023).

1.2.1 Dopamina - Sistema Mesocorticolímbico - Circuito de recompensa

El consumo de drogas está impulsado por los efectos farmacológicos de una sustancia que se experimenta como gratificante; lo que se debe a que todos los psicoestimulantes facilitan transitoriamente la neurotransmisión mediada por monoaminas, entre ellas la **dopamina** (DA) (Godino et al., 2015; Volkow et al., 2019). Este neurotransmisor tiene múltiples funciones esenciales, tales como la regulación de las neuronas motoras, la función de la memoria espacial, la motivación, la excitación, la recompensa y el placer; entre otras (Klein et al., 2019).

La presencia de DA producto del consumo de drogas determina alteraciones conductuales características que derivan en cambios duraderos en la expresión de genes y proteínas en circuitos cerebrales específicos, en particular el **circuito de recompensa** (Volkow et al., 2019). Este circuito comprende un grupo de regiones cerebrales tales como como el área tegmental ventral (VTA), el núcleo accumbens (NAc), el **hipocampo**, la amígdala y la corteza prefrontal (CPFr) (Cooper et al., 2017; Godino et al., 2015). El mismo está formado por un conjunto de conexiones neuronales, principalmente dopaminérgicas, denominadas **sistema mesocorticolímbico**, que conectan diversos nodos cerebrales (Cooper et al., 2017; Godino et

al., 2015). Específicamente, las neuronas dopaminérgicas del VTA proyectan al NAc e inervan varias regiones de la CPFr, la amígdala central y basolateral, el hipocampo; entre otras (Russo & Nestler, 2013) (Figura 3).

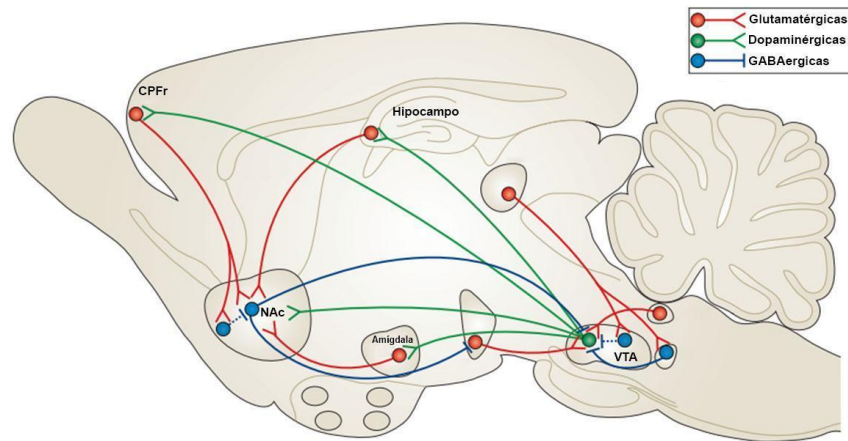


Figura 3. Esquema representativo de las principales conexiones dopaminérgicas en el cerebro de roedores. Área tegmental ventral (VTA), Núcleo accumbens (NAc), corteza prefrontal (CPFr). Imagen adaptada de Russo & Nestler (2013).

Cabe destacar que la estimulación dopaminérgica repetida derivada del consumo de psicoestimulantes induce neuroadaptaciones en múltiples sistemas de neurotransmisores, incluido el sistema glutamatérgico que aumenta la excitabilidad neuronal y modula la neuroplasticidad, el sistema GABAérgico que inhibe la transmisión del potencial de acción, entre otros (Volkow et al., 2019) y, aunque estos circuitos neuronales funcionan en paralelo, pueden tener diferentes roles en el proceso de adicción (Santos-Toscano et al., 2023).

1.2.2 Hipocampo

El hipocampo es una región cerebral asociada a funciones relacionadas con los procesos de memoria y aprendizaje (Kutlu & Gould, 2016). La misma es una estructura muy plástica, importante para procesar información de orden superior y es sensible a factores ambientales tales como el estrés (Yagi & Galea, 2019) y las hormonas gonadales (Rune & Frotscher, 2005). Además, este nodo cerebral tiene particular importancia en el proceso de adicción a drogas de abuso, ya que se encuentra implicado en varios mecanismos, incluyendo la recaída en el consumo (Eisch & Harburg, 2006).

En roedores, es una estructura relativamente grande localizada en el lóbulo temporal que está en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que se denomina sistema o formación hipocampal. La misma está constituida por el hipocampo propiamente dicho, el giro dentado, el subiculum y la corteza entorrinal (Andersen et al., 2006). Esta región está conformada por una capa de células piramidales, denominada capa principal, las cuales se encuentran distribuidas en una trayectoria en forma de “C” invertida, donde se distingue el “Cuerno de Amón” (CA) determinado por tres regiones denominadas CA1, CA2 y CA3 (Burwell & Agster, 2008; Neves et al., 2008) (Figura 4).

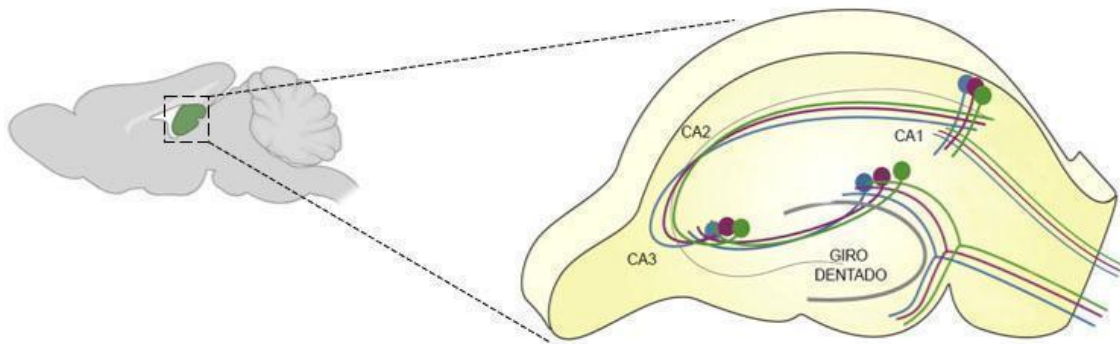


Figura 4. Anatomía del hipocampo. Las neuronas piramidales se encuentran dispuestas en forma de C invertida, se pueden distinguir 3 regiones principales, CA1, CA2 y CA3 que se encuentran alrededor del giro dentado. Imagen adaptada de Bartsch & Wulff (2015).

El hipocampo es un **área sexualmente dimórfica**, existiendo evidencia que indica diferencias sexuales en su morfología, conectividad y fisiología tanto en humanos como en roedores; también se observan patrones diferenciados por el sexo en procesos como la neurogénesis, el aprendizaje espacial, el condicionamiento al miedo, la plasticidad, la cognición y una serie de trastornos que afectan a la integridad del mismo, los cuales luego pueden contribuir a inducir una mayor vulnerabilidad a un tipo determinado de enfermedad según el sexo (Yagi & Galea, 2019). Estas diferencias se deben, en parte, a que el hipocampo es un blanco para las acciones neuromoduladoras de las hormonas esteroideas sexuales tales como el E2 y la T procedentes de las gónadas, las cuales son capaces de llegar al cerebro a través de la circulación sanguínea y cruzar la barrera hematoencefálica (Mukai et al., 2006; Santos-Toscano et al., 2023). Además, ciertas evidencias sugieren que el hipocampo es capaz de sintetizar neuroesteroides, específicamente E2 y DHT (Fester & Rune, 2015) a partir de colesterol (Fester & Rune, 2021). Sumado a esto, existen estudios que demuestran que roedores

machos y hembras adultos poseen en el hipocampo las enzimas necesarias para sintetizar progesteronas, andrógenos y estrógenos, además se manifiesta la actividad de la aromatasas que actúa regulando la síntesis local de E2 (Frick et al., 2015). Se propone que el hipocampo es la fuente endógena principal de E2, ya que en ratas machos y hembras adultas sus niveles son más altos en el hipocampo que en el plasma sanguíneo, incluso se sabe que esta hormona continúa siendo sintetizada en ausencia de ovarios, desplazando así a las gónadas como productoras principales de hormonas esteroideas (Frick et al., 2015).

En cuanto a su desarrollo, se sabe que el área hipocámpal humana comienza a formarse a partir del segundo trimestre, entre las semanas 18 y 20 de gestación su forma general ya se asemeja a la de un adulto, sin embargo, continúa diferenciándose en la infancia. En primates no humanos y roedores, estudios de datación celular también demuestran un período prolongado de desarrollo embrionario y PN de la formación de esta estructura. El desarrollo prolongado de la formación del hipocampo durante el período gestacional tardío y PN temprano significa que el patrón citoarquitectónico se establece durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro y, por lo tanto, está potencialmente sujeto a la influencia de las hormonas esteroideas gonadales (Kight & McCarthy, 2020).

El hipocampo expresa tanto receptores de estrógenos (ER, de sus siglas en inglés) como receptores de andrógenos (AR, de sus siglas en inglés), independientemente del sexo (Fester, 2015) los cuales son necesarios para la señalización y se encuentran presentes durante períodos tempranos del desarrollo, aunque considerablemente en menor proporción que en el cerebro adulto. En los roedores, la expresión del AR se encuentra en el hipocampo ya en E15 y aumenta con el desarrollo PN (Kight & McCarthy, 2020). Existen dos tipos de ER intracelulares en el hipocampo, ER α y ER β , que se pueden encontrar tanto en roedores machos como hembras; sin embargo, estudios demuestran que su presencia es diferente en los machos y varía con el ciclo estral de las hembras (Kight & McCarthy, 2020). Durante el desarrollo, el ER α se expresa en las capas de células piramidales de CA1 y CA3 en la primera semana PN y luego sus niveles disminuyen. El ER β es igualmente abundante en las subregiones CA1 y CA3 durante la primera semana PN (Kight & McCarthy, 2020). Además, el área CA1 del hipocampo expresa una proteína G acoplada a un receptor sensible a E2, denominada GPR30, la cual se localiza en la densidad postsináptica (PSD, de sus siglas en inglés) de espinas dendríticas y se propone como capaz de modular los efectos de los estrógenos en la sinapsis a partir de su unión específica a proteínas de andamiaje que se encuentran en estas estructuras (Akama et al., 2013).

Como en otras regiones del cerebro en desarrollo, en el hipocampo se produce la síntesis de E2 a partir de la T perinatal circulante. La actividad de la aromatasas en este tejido es evidente

durante la primera semana PN y luego disminuye significativamente (Kight & McCarthy, 2020), siendo el nivel de actividad de esta enzima notablemente más bajo en el hipocampo en comparación con otras regiones del cerebro con alto dimorfismo sexual como el área preóptica, el hipotálamo mediobasal y la amígdala. Sin embargo, esta actividad se corresponde exactamente con los niveles de E2, que alcanzan su máximo antes del nacimiento y disminuye diez veces durante la primera semana PN. Curiosamente, no se encontraron diferencias sexuales en el contenido de E2 en el hipocampo a lo largo de la vida (Kight & McCarthy, 2020).

1.2.3 Drogas psicoestimulantes

El uso ilícito e indebido de **drogas psicoestimulantes** es un problema mundial creciente. En la última década, se ha registrado una tendencia creciente en su consumo, siendo que, en todo el mundo, entre 21 y 34 millones de personas consumieron psicoestimulantes tales como la cocaína y las anfetaminas (Hersey et al., 2023). Por lo que los estudios en el marco de la adicción a drogas, principalmente del tipo psicoestimulantes, están enfocados a dilucidar los mecanismos que subyacen a cambios adaptativos neuronales luego del consumo repetido, lo que podría explicar la transición de su uso casual y recreativo hacia un uso que genera comportamientos adictivos (Godino et al., 2015).

Una característica de los psicoestimulantes es su capacidad de reducir los umbrales de alerta o vigilia, de modo que el individuo responde con más facilidad o prontitud a los estímulos tanto exógenos como endógenos (Robledo, 2008). Hay diversos tipos de psicoestimulantes los cuales pueden ser clasificados en tres grandes familias: anfetamínicos (dextroanfetamina, metanfetamina, metilfenidato), alcaloides naturales (cocaína, nicotina) y metilxantinas (cafeína) (Robledo, 2008).

Las drogas de abuso tipo **anfetamina** (Anf) son fenilisopropilaminas, cuyo isómero más potente a nivel central es el dextro (d-anfetamina), que tiene la capacidad de alterar profundamente las funciones corporales y cerebrales, ya que es una sustancia liposoluble capaz de traspasar membranas celulares, la barrera hematoencefálica y la placenta (Robledo, 2008), además de provocar toxicidad crónica y poseer un alto potencial de abuso y dependencia (Fernández Espejo, 2006). Al consumir este tipo de drogas psicoestimulantes se producen ciertos comportamientos característicos; por ejemplo: en roedores tras una administración aguda de una dosis moderada de la droga, el primer efecto que se origina es un fuerte incremento de la actividad locomotora general; mientras que a dosis mayores se observa una inducción de conductas repetitivas estereotipadas, tales como el olfateo, el movimiento de la

cabeza y el roer (Berke & Hyman, 2000). En humanos, otros comportamientos asociados a su consumo son el sentimiento de euforia, aumento del estado de alerta, excitación y disminución del apetito (Fernández Espejo, 2006; Robledo, 2008). Se sabe que el consumo crónico de Anf trae aparejados efectos deletéreos en la cognición, incluyendo problemas de memoria, atención, flexibilidad cognitiva, inhibición cognitiva y toma de decisiones. Estos déficits cognitivos perduran durante el período de abstinencia, ya que interrumpen el aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo, y su plasticidad asociada (Kutlu & Gould, 2016).

La acción de los psicoestimulantes involucra la liberación de varios neurotransmisores del tipo monoaminas, tales como DA, serotonina, adrenalina y noradrenalina; de allí su efecto estimulante. Principalmente, actúan a partir de diversos mecanismos en los terminales axónicos de neuronas liberadoras de dichas monoaminas, generando así un aumento de la concentración de estos neurotransmisores a nivel del espacio sináptico (Fernández Espejo, 2006; Godino et al., 2015; Robledo, 2008). La Anf, particularmente, posee un mecanismo de acción complejo, ya que ejerce múltiples efectos en los terminales axónicos que en conjunto actúan para aumentar los niveles de DA extra-sinápticos provocando su efecto estimulante (Fernández Espejo, 2006; Robledo, 2008). Por un lado, la Anf ejerce el rol de inhibidor competitivo del transportador de dopamina (DAT, de sus siglas en inglés) ya que es capaz de actuar como su sustrato, por lo que el transportador capta Anf en lugar de DA y la integra al terminal sináptico. Una vez dentro del terminal, Anf es transportada al interior de las vesículas sinápticas por medio de difusión y a través del transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2, de sus siglas en inglés). La Anf puede interrumpir el gradiente de protones existente en las membranas de estas vesículas sinápticas y así también su funcionamiento, por lo que aumenta el pH de estas y produce que la DA se libere dentro del terminal sináptico, donde finalmente escapa de la célula mediante un transporte reverso a través del DAT lo que resulta en un dramático incremento de la DA extracelular (Fernández Espejo, 2006; Robledo, 2008). Otro mecanismo que tiene como consecuencia el aumento de los niveles extracelulares de DA está relacionado con la alteración en la regulación de dos enzimas que intervienen en la síntesis y catabolismo del neurotransmisor, ya que la Anf promueve la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de DA, e inhibe la actividad de la monoamina oxidasa (MAO) enzima citosólica que degrada la DA (Fernández Espejo, 2006; Robledo, 2008; Sulzer, 2011) (Figura 5).

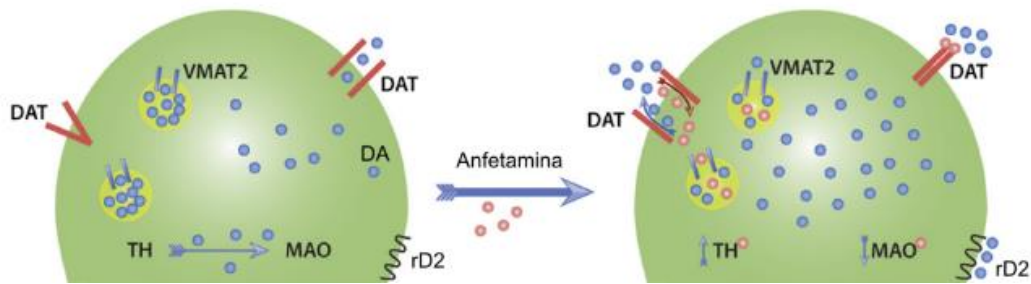


Figura 5. Mecanismo de acción de Anf. La Anf ejerce múltiples efectos que en conjunto actúan para aumentar los niveles de DA extra-sinápticos por un mecanismo de liberación que es independiente de la fusión de vesículas sinápticas e inhibe la recaptación de DA. La Anf es sustrato de DAT y actúa favoreciendo la liberación de DA citosólica a través del transporte reverso. Además, actúa como inhibidor competitivo del DAT, y por lo tanto hace más lenta la recaptación de DA a través del mismo. Una vez en el citosol, Anf aumenta la DA citosólica por tres vías: activando la TH; inhibiendo la MAO y redistribuyendo la DA desde las vesículas al citosol. Imagen adaptada de Sulzer (2011).

1.2.4 Hormonas sexuales y adicción a drogas de abuso

Algunos de los factores que generan diferencias sexuales en el proceso de adicción a drogas de abuso son los cambios específicos del sexo en los niveles de hormonas gonadales y en la actividad de los circuitos de recompensa dopaminérgicos (Santos-Toscano et al., 2023). Se ha sugerido que el E2 promueve la liberación de DA, ya que la unión con sus receptores de membrana situados en las estructuras de recompensa genera la consecuente liberación del neurotransmisor; lo que tiene la finalidad de promover la motivación para la recompensa y así mejorar el efecto de refuerzo de las drogas más adictivas (Santos-Toscano et al., 2023). Se postula que esta acción es dependiente del sexo debido a una distribución desigual de estos receptores entre machos y hembras. De hecho, cuando se presentan niveles elevados de estrógenos se observa un aumento en los efectos de recompensa de las sustancias y su ingesta en las hembras, lo que puede estar relacionado con una mayor actividad dopaminérgica en el sistema de recompensa (Santos-Toscano et al., 2023).

1.2.5 Sensibilización conductual

Otros fenómenos que se asocian al consumo repetido de Anf son la tolerancia, la sensibilización y la dependencia (Robledo, 2008). Es de nuestro particular interés el estudio de la **sensibilización conductual** la cual se define como el incremento progresivo y persistente de un efecto producido por la exposición repetida a una droga psicoestimulante (Gatica et al.,

2020) que por lo general induce efectos activadores psicomotores tales como un aumento gradual de la actividad locomotora, comportamiento rotacional o patrones de movimientos estereotipados (Berke & Hyman, 2000; Robinson & Berridge, 1993).

La expresión del fenómeno de sensibilización se debe a una desensibilización de los receptores dopaminérgicos presinápticos (D2), los cuales modulan negativamente la liberación de DA en algunas áreas cerebrales como el NAc. Así, la administración de la droga supondrá un mayor incremento en la DA sináptica, con el consiguiente aumento en la intensidad del efecto. La consecuente liberación de DA genera que la sensibilización sea un efecto duradero y que se pueda establecer más rápidamente en casos en que la droga se administre de forma intermitente (Robledo, 2008).

El proceso de sensibilización puede ser analizado temporalmente en dos fases: la fase de **inducción** (o desarrollo) y la de **expresión**, durante la consolidación de la adicción. Los cambios plásticos que se producen en ambas fases involucran mecanismos neuroquímicos y moleculares diferentes, además de ocurrir en estructuras neuroanatómicas distintas (Robinson & Becker, 1986). En la inducción participa de modo crítico el circuito mesocorticolímbico, involucrando principalmente el VTA, donde ocurren cambios celulares y moleculares de carácter transitorio que fundamentan la sensibilización y facilitan el aprendizaje adictivo; mientras que en la expresión se encuentran involucradas áreas como NAc, el Estriado dorsal (EstD) o la CPFr, donde se producen cambios neuronales y bioquímicos que generan el hábito adictivo (Fernández Espejo, 2006). En el proceso de sensibilización pueden estar involucradas variables ambientales, temporales, individuales y aquellas relacionadas con la dosis o el protocolo de administración de la droga (Mlewski, 2011). Estudios han demostrado que variables ambientales, tales como la administración de Anf en un contexto novedoso, juega un papel importante en el desarrollo de la sensibilización locomotora a los psicoestimulantes (Mlewski et al., 2016).

1.3 Plasticidad sináptica y espinas dendríticas

Las respuestas neuroadaptativas que subyacen a la adicción a drogas de abuso con frecuencia involucran procesos de plasticidad sináptica. Este fenómeno comprende las modificaciones, dependientes de la actividad, de la fuerza o eficacia de la transmisión de sinapsis preexistentes (Magee & Grienberger, 2020). Tanto el tipo como el grado de plasticidad pueden diferir con la edad, la región del cerebro y las condiciones experimentales (Sorra &

Harris, 2000). En los circuitos neuronales adultos puede implicar el fortalecimiento o debilitamiento de sinapsis, lo que se conoce como **plasticidad funcional**, así como la formación y/o eliminación de las mismas, fenómeno conocido como **plasticidad estructural** (Holtmaat & Svoboda, 2009).

Uno de los sitios donde reside la plasticidad sináptica son las **espinas dendríticas**, pequeñas proyecciones morfológicamente dinámicas de longitudes que varían desde 0,2 hasta 3µm y volúmenes de 0,001 a 1 µm³ (Sorra & Harris, 2000) y que pueden formarse y/o desaparecer en períodos de tiempo cortos. Estas estructuras probablemente evolucionaron para soportar la gran cantidad de sinapsis que ocurren entre neuronas individuales, por lo que permiten que las dendritas lleguen más allá de su superficie para hacer sinapsis con axones de filas adyacentes, aumentando así la densidad de posibles conexiones sinápticas (Sorra & Harris, 2000). Dependiendo del estímulo, las espinas dendríticas pueden sufrir tanto cambios morfológicos como volumétricos. En relación a esto, ciertos estudios han demostrado que durante el proceso de aprendizaje, tanto la densidad de espinas como su maduración aumentan significativamente; otras investigaciones revelan que durante el proceso de formación de la memoria, los circuitos neuronales se estabilizan a medida que la conectividad sináptica se fortalece junto con un aumento prominente en la densidad de las espinas maduras (Chidambaram et al., 2019). Las espinas dendríticas son los socios postsinápticos de la mayoría de las sinapsis excitatorias en el SNC y, comúnmente se toman como indicativo de la formación de sinapsis (Brandt et al., 2020).

Durante el desarrollo del cerebro, desde el embrión hasta la edad adulta, la plasticidad de las espinas dendríticas es el fenómeno crucial más relevante en la formación de nuevos circuitos neuronales. Frecuentemente, diferentes condiciones fisiológicas o patológicas ocasionan anomalías tanto en la morfología como en el número de espinas dendríticas que repercuten en su desarrollo, mantenimiento y plasticidad (Chidambaram et al., 2019). La densidad de las espinas varía con la edad, alcanzando su punto máximo en la adolescencia, luego disminuye lentamente hasta la edad adulta; es decir, que a medida que el cerebro madura, el recambio y la densidad de las espinas dendríticas se estabiliza y la tasa de eliminación se ralentiza (Chidambaram et al., 2019).

En relación con Anf, se sabe que la misma es capaz de generar un efecto espinogénico en áreas del circuito de recompensa, particularmente en el hipocampo de ratones machos PN 33-40 (Ferrerias et al., 2017), lo que sugiere que los mecanismos moleculares involucrados en la modulación de la plasticidad sináptica son usurpados por las drogas de abuso. Los cambios dependientes de la actividad en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo están

asociados con el aprendizaje y la memoria, los cuales se encuentran íntimamente relacionados a muchos aspectos del proceso adictivo, incluyendo la recaída al uso de drogas (Berke & Hyman, 2000).

1.3.1 Elementos estructurales

Las espinas dendríticas poseen dos elementos estructurales principales: el citoesqueleto de actina y la PSD. En las neuronas, la **actina filamentosa** (actina F) es particularmente rica en las espinas dendríticas, formando redes y haces que son componentes del citoesqueleto que soportan la estructura de estas protuberancias. Los cambios morfológicos que sufren las espinas son gracias a la modulación dinámica de la actina y la actividad de los receptores de glutamato. La **PSD** es una estructura densa en electrones que se encuentra justo debajo de la membrana postsináptica y posee varias proteínas de andamiaje (Sekino et al., 2007). Otros componentes presentes que conforman la maquinaria postsináptica son receptores de membrana (NMDA, AMPA y receptores metabotrópicos), GTPasas pequeñas y proteínas asociadas, micro ARN, proteínas de unión a ARNm, factores de transcripción, matriz extracelular y moléculas de adhesión (Chidambaram et al., 2019). Estos componentes se encuentran conformando las 3 estructuras características (Segura & Barenque, 2018) (Figura 6):

- Una **cabeza bulbosa** que es la encargada de hacer contacto con el axón y alberga en su interior a la PSD; siendo su principal función la de capturar y reciclar el pool sináptico móvil de receptores (Newpher & Ehlers, 2009).
- Un **cuello** que vincula la cabeza con la base de la espina, el cual cumple la función de aislar y restringir la difusión de moléculas de señalización postsinápticas del resto de la dendrita, protegiéndola de eventos de excitotoxicidad (Newpher & Ehlers, 2009).
- Una **base** en la unión con el eje de la dendrita (Newpher & Ehlers, 2009).

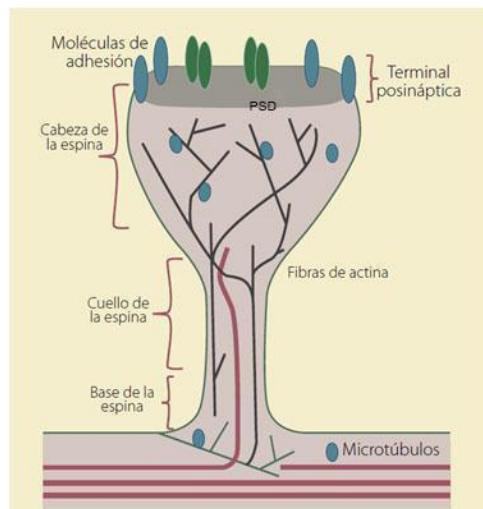


Figura 6. Componentes estructurales principales de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones dinámicas que se encuentran a lo largo de las dendritas, las cuales están conformadas por tres estructuras principales: la cabeza, el cuello y la base. El disco gris representa la PSD, también se visualizan el pool de receptores que posee la cabeza y las fibras de actina. Imagen adaptada de Segura & Barenque (2018).

1.3.2 Clasificación morfológica

Según su morfología las espinas pueden clasificarse en tres categorías, correspondiendo cada una a un grado diferente de desarrollo (Figura 7):

- **“Tipo I” o “Stubby”:** son aquellas que no poseen cuello y son las más abundantes durante el desarrollo. Se las considera como estructuras plásticas e inmaduras que se encuentran fuertemente acopladas al eje dendrítico, por lo que los cambios en la densidad de este tipo de espinas pueden impactar de manera desproporcionada en la excitabilidad neuronal comparado a otros tipos de espinas. Además, se cree que la falta de un cuello evita las conexiones inhibitorias (Golden & Russo, 2012; Noguchi et al., 2005; Schmidt & Eilers, 2009; Sekino et al., 2007).
- **“Tipo II” o “Mushroom”:** poseen un cuello corto y una cabeza relativamente grande, por lo que presentan una PSD más grande y compleja con una mayor densidad de receptores glutamatérgicos. Son consideradas como las más estables y menos plásticas, por lo que se dice que son espinas maduras. Algunos autores las clasifican como “espinas de memoria” (Brandt et al., 2020; Golden & Russo, 2012; Harris et al., 1992; Matsuzaki et al., 2001; Nicholson-Dykstra et al., 2005; Sekino et al., 2007).
- **“Tipo III” o “Thin”:** poseen un cuello estrecho y una cabeza pequeña. Son consideradas estructuras plásticas e inmaduras y contienen sinapsis excitadoras más

pequeñas. Algunos autores las clasifican como “espinas de aprendizaje” (Brandt et al., 2020; Sekino et al., 2007).

Sumado a estos tipos de espinas, las neuronas inmaduras presentan protuberancias delgadas sin cabeza, llamadas **Filopodios dendríticos**, los cuales carecen de la maquinaria postsináptica necesaria para la función sináptica completa. Los filopodios se proponen como precursores de las espinas dendríticas, ya que a medida que el cerebro recibe información sobre el contexto durante su desarrollo, el número de filopodios disminuye rápidamente y simultáneamente el número de espinas bulbosas aumenta (Sekino et al., 2007). Específicamente, en el hipocampo en desarrollo, las dendritas muestran numerosos filopodios, algunos de los cuales tienen sinapsis durante las primeras 2 a 3 semanas PN. Incluso cuando los filopodios son relativamente abundantes durante el período PN temprano, solo alrededor del 25% de las sinapsis ocurren en ellos, mientras que el otro 75% ocurre directamente en los ejes dendríticos (Sorra & Harris, 2000).

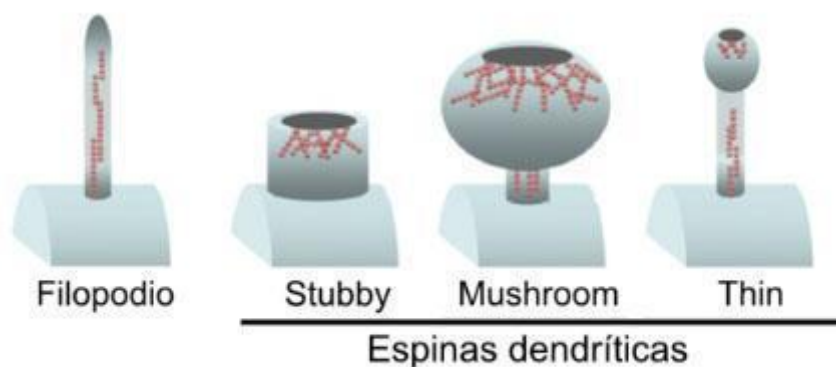


Figura 7. Morfología del filopodio y de las espinas dendríticas. Representación esquemática de las morfologías del filopodio y de los tres tipos de espinas dendríticas: tipo I o “Stubby”, tipo II o “Mushroom” y tipo III o “Thin”. Los discos grises representan la PSD y las cadenas de círculos rojos representan la actina filamentososa. Imagen adaptada de Sekino et al. (2007).

1.3.3 Hormonas sexuales y espinas dendríticas hipocampales

Como se expresó anteriormente el hipocampo es una región blanco para las acciones neuromoduladoras de las hormonas esteroideas sexuales, actuando sobre las espinas dendríticas y la densidad de sinapsis que se llevan a cabo en esta área (Brandt et al., 2020). La evidencia sugiere que la formación de espinas es inducida principalmente por estrógenos que se sintetizan localmente en el cerebro (Brandt et al., 2020; Frick et al., 2015), que pueden actuar de manera local y rápida sobre las neuronas (Mukai et al., 2006). Por ejemplo, se demostró que el E2 es

esencial para el mantenimiento de la densidad sináptica y la potenciación a largo plazo (LTP, de sus siglas en inglés) en las mujeres, pero no en los hombres, y de manera inversa, la DHT en los hombres, pero no en las mujeres (Brandt et al., 2020; Fester & Rune, 2021).

Diversos estudios dejan en evidencia que tanto el E2 exógeno como endógeno produce un aumento en la densidad de espinas dendríticas en neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo en ratas hembras adultas (Frick et al., 2015). En relación a esto, se observaron diferencias durante las distintas fases del ciclo estral, siendo el proestro el momento del ciclo que representó mayor densidad de espinas, fase que se caracteriza por altos niveles de estrógeno y progesterona, por lo que presumiblemente dicho mecanismo está mediado por la hormona liberadora de gonadotropina, que regula la síntesis de E2 en el hipocampo; mientras que en las fases donde baja la concentración hormonal y en animales ovariectomizados se observa un declive en la densidad de espinas (Brandt et al., 2020; Frick et al., 2015). Por lo tanto, la ciclicidad en las hembras dificulta la comparación de la densidad de espinas dendríticas entre sexos, sin embargo, se han descrito con frecuencia diferencias sexuales en el desempeño de diversas tareas cognitivas, que podrían reflejarse en diferencias estructurales (Brandt et al., 2020).

La unión de esteroides sexuales a los receptores de hormonas intracelulares hace que los complejos de receptores de hormonas se trasladen al núcleo, donde se unen a elementos de respuesta hormonal en el ADN e inician transcripción de genes (Frick et al., 2015). Si bien no está claro cómo E2 podría facilitar en CA1 la formación de espinas dendríticas, se proponen varios mecanismos posibles como la inducción de modificaciones postraduccionales de proteínas dendríticas, alterando la degradación de proteínas, aumentando la síntesis de proteínas constitutivas o desencadenando la síntesis de proteínas nuevas, ya que todos estos mecanismos han sido implicados en el hipocampo, la memoria y/o la plasticidad sináptica (Frick et al., 2015).

Debido a que las espinas dendríticas se encuentran en las neuronas piramidales excitatorias, se cree que el aumento de la densidad de las espinas conduce a una mayor plasticidad sináptica, ya que el E2 tiene numerosos efectos sobre la excitabilidad neuronal y plasticidad en el cerebro. Por ejemplo, el efecto más notable de E2 en la fisiología del hipocampo es su capacidad para potenciar el LTP dependiente de NMDA en sinapsis del área CA3-CA1 en hembras de roedores, dando como resultado un aumento persistente en la sinapsis, por lo que se cree que la excitabilidad subyace a la formación de la memoria (Frick et al., 2015; Montoya & Carrer, 1997).

En base a lo expuesto anteriormente, se plantea como **hipótesis** de este trabajo que la Anf ejerce un efecto diferencial entre sexos tanto en la respuesta conductual como en la espinogénesis hipocampal. Siendo la contribución fundamental de este trabajo generar sólidas evidencias sobre los efectos diferenciales del sexo en el mecanismo de sensibilización a drogas de abuso.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la contribución del sexo en las respuestas neuroadaptativas tanto conductuales como estructurales asociadas a la administración de Anf previo a los efectos activadores de las hormonas gonadales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la sensibilización conductual provocada por la administración de Anf en ratones Thy-1 machos y hembras a PN 21-23.
- Analizar si existen diferencias sexuales en la densidad y morfogénesis de espinas dendríticas de neuronas piramidales del área hipocampal CA1 provocada por la administración de Anf en ratones Thy-1 machos y hembras a PN 23.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales de experimentación

Se trabajó con ratones transgénicos de la cepa C57BL/6J los cuales expresan la proteína fluorescente verde (eGFP, de sus siglas en inglés) bajo el control de una región modificada del promotor Thy; llamados B6. Cg-Tg (Thy1-eGFP) MJrs/J. Se utilizaron machos y hembras infantiles de PN 21-23 a fin de evaluar las diferencias sexuales debidas a la masculinización del cerebro durante el periodo crítico, antes del inicio de la pubertad; evitando así la exposición a los efectos activadores de las hormonas gonadales. El mantenimiento y la amplificación de la colonia se realizó mediante la cruce de ratones machos heterocigotas B6. Cg-Tg (Thy1-eGFP) MJrs/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EEUU) con hembras *wild type* C57BL / 6J.

Los animales fueron mantenidos en bioterio climatizado ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), dentro de jaulas a cielo abierto con ciclos de luz/oscuridad (12:12 h) y agua y comida *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a las pautas establecidas para el bienestar animal y contaron con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación (CICUAL; Res: 013/2021).

2.2 Genotipificación

2.2.1 Obtención de muestras

Se tomaron muestras de colas de ratones de PN 15 para lo cual se procedió a cortar 0,2 cm del extremo de la cola, se cauterizó la herida y, posteriormente, se identificó a cada individuo con marcas en las orejas.

2.2.2 Extracción y purificación del ADN genómico

Las muestras fueron colocadas en microtubos a los cuales se les añadió 500 μl de buffer de extracción (200 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,5, 2% SDS y 5 mM EDTA pH 8) y 2,5 μl de proteinasa K (Productos Bio-Lógicos, Argentina). Posteriormente se los incubó entre 12-15 h a 55°C en baño termostático. Luego de la incubación las muestras se centrifugaron a 14.000 xg durante 10 min, se separó la fase acuosa conteniendo el ADN en un nuevo microtubo y el sobrenadante fue descartado. A continuación, a cada microtubo se le añadió 400 μl de isopropanol a temperatura ambiente (TA), se mezcló por inversión y se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol 70% mediante dos ciclos de centrifugación de 5 min a 15000 xg. Luego de los lavados, se descartó el sobrenadante y se extrajo el etanol remanente de los tubos, los cuales se dejaron secar durante 60 min a TA

en un lugar protegido del polvo. Finalmente, las muestras se diluyeron en 50 µl de H₂O libre de nucleasas, se incubaron por 2 horas a TA y se almacenaron a - 20 °C hasta su uso.

2.2.3 Determinación de la expresión de Thy-1

La expresión génica se evaluó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) empleando una mezcla de reacción que constó de los siguientes volúmenes para cada muestra: 2 µl de PCR buffer 10X; 0,8 µl de MgCl₂ 50mM; 0,4 µl de dNTPs 10mM; 1 µl de primer 5´AAGTTCATCTGCACCACCG 3´ 20 µM y 1 µl de primer 5´TCCTTGAAGAAGATGGTGCG 3´ 20 µM; ambos primers específicos del gen thy-1; 0,75 µl de primer 5´CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT 3´ 20 µM y 1 µl de primer 5´GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC 3´ 20 µM; ambos primers de control interno de la PCR; 12,1 µl de H₂O y 0,2 µl de Taq ADN Polimerasa (Pegasus, Productos Bio-Lógicos, Argentina). Posteriormente se colocaron 19 µl de la mezcla de reacción en cada microtubo y se le añadió 1 µl de muestra de ADN. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf® Mastercycler®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) bajo las siguientes condiciones de ciclado: 1 min, 30 seg 94°C (1 vez); 30 seg 94°C (35 veces); 1 min 60 °C (35 veces); 1 min 72 °C (35 veces); 2 min 72 °C (1 vez).

2.2.4 Electroforesis

A cada producto de la PCR se le añadió 3 µl de GelRed 100X (Biotium, San Francisco, EEUU) en loading buffer (azul de bromofenol 0.05%, glicerol 30%) y se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 90 V constantes durante 80 min. Finalmente, el gel fue visualizado en transiluminador con luz UV (Cytiva, ImageQuant 800, Amersham biosciences, Reino Unido).

2.3 Protocolo de dos Inyecciones (PDI)

Este protocolo constó de dos fases: en el primer día (Fase 1) los animales de PN 21 fueron colocados en un ambiente novedoso (campo abierto: cilindro blanco de 40 cm de diámetro, de paredes plásticas) durante un periodo de adaptación de 10 min, luego fueron administrados con una inyección intraperitoneal (i.p) de solución salina (Sal, NaCl 0,9%) o d-anfetamina [Anf (4 mg/ kg), (Parafarm, Buenos Aires, Argentina)] y se los dejó por 60 min en el campo abierto para evaluar el efecto agudo de la droga. Al finalizar la prueba, los individuos fueron regresados a su jaula hogar junto con su madre. Luego de dos días de abstinencia, los animales de PN 23, fueron colocados nuevamente en el campo abierto durante 10 min y

posteriormente inyectados i.p con Sal o Anf y se los dejó por 60 min en el campo abierto (Fase 2) para evaluar la sensibilización comportamental (Figura 8).

Todos los experimentos se realizaron durante el ciclo de luz, entre las 10:00 am y las 3:00 pm en una sala de comportamiento aislada. El día previo al PDI los animales fueron manipulados para reducir los niveles de ansiedad y facilitar los procedimientos experimentales, además, fueron pesados para determinar las dosis de Sal y Anf correspondientes.

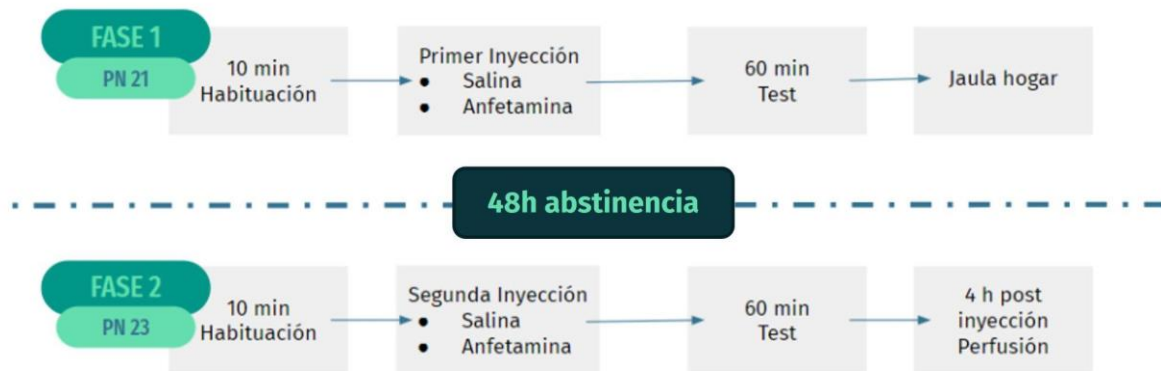


Figura 8. Esquema del protocolo de dos inyecciones (PDI). El protocolo para el análisis conductual constó de dos fases. Fase 1, los ratones de PN 21 fueron habituados durante 10 min, luego inyectados i.p con Sal o Anf y expuestos al campo abierto durante 60 min, para luego ser devueltos a la jaula hogar. Después de 48 h de abstinencia, se realizó la Fase 2 repitiendo el procedimiento en los animales PN 23. Finalmente, 4 h después de la última inyección los animales fueron perfundidos.

En función de este protocolo quedaron definidos los siguientes grupos experimentales (Figura 9): (1) animales que recibieron dos inyecciones de Sal (Sal-Sal); (2) animales que recibieron Sal en la fase 1 y Anf en la fase 2 (Sal-Anf); (3) animales que recibieron Anf en la fase 1 y Sal en fase 2 (Anf-Sal) y (4) animales que recibieron dos inyecciones de Anf (Anf-Anf). Los ratones machos y hembras fueron divididos al azar para asignar los tratamientos.

GRUPOS EXPERIMENTALES

| Fase 1 (PN 21) | Fase 2 (PN 23) |
|----------------|-----------------|
| Hembras Sal | Hembras Sal-Sal |
| | Hembras Sal-Anf |
| Hembras Anf | Hembras Anf-Sal |
| | Hembras Anf-Anf |
| Machos Sal | Machos Sal-Sal |
| | Machos Sal-Anf |
| Machos Anf | Machos Anf-Sal |
| | Machos Anf-Anf |

Figura 9. Grupos experimentales. Hembras y machos que recibieron dos inyecciones de Sal (Sal-Sal); hembras y machos que recibieron Sal en la fase 1 y Anf en la fase 2 (Sal-Anf); hembras y machos que recibieron Anf en la fase 1 y Sal en fase 2 (Anf-Sal y hembras y machos que recibieron dos inyecciones de Anf (Anf-Anf).

2.4 Análisis conductual

Durante ambas fases, se registró por medio de video-cámaras la actividad locomotora de los animales para posteriormente realizar el análisis de la distancia recorrida mediante el software FIJI / Image J (National Institutes of Health). Los videos se analizaron en escala de grises, utilizando 3000 cuadros (“frames”) en la fase de habituación y 18000 frames para el test, correspondientes a 10 y 60 min de actividad, respectivamente. La imagen fue calibrada a partir del diámetro conocido del campo abierto (40cm); quedando establecida y registrada una escala para cada video analizado. Posteriormente, mediante el plugin “Animal tracker” se definió una región de interés (ROI, de sus siglas en inglés) dentro de la cual el animal se movilizaba, luego se sustrajo el fondo (Figura 10 A), se aplicó un umbral (“threshold”) y un filtro de tamaño máximo y mínimo de pixel; lo que permitió determinar el animal en movimiento para que el software establezca en forma vectorial el recorrido del mismo (“track” o trayectoria) (Figura 10 B). A partir de la ROI y la trayectoria, se definió la distancia recorrida total en metros y la distancia recorrida en bloques de 5 min para cada animal.

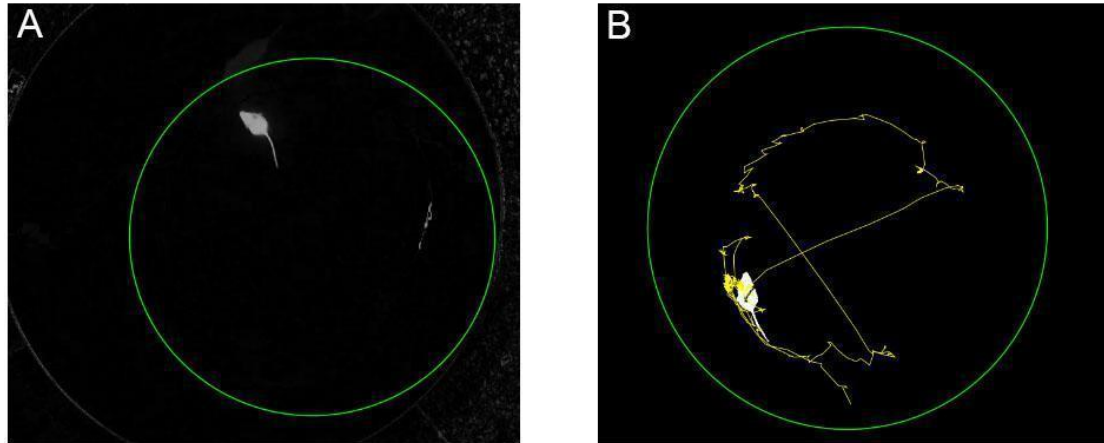


Figura 10. Análisis conductual. (A) Cuadro donde se observa el campo abierto, fue determinada la ROI (en color verde), se sustrajo el fondo y se filtró el animal. (B) Cuadro donde se observa el campo abierto, las líneas amarillas indican la trayectoria recorrida por el animal (track).

2.5 Procesamiento de muestras para Microscopia Confocal

Para el análisis de espinas dendríticas se utilizaron ratones thy-1 eGFP positivos, que debido a la expresión del transgen, presentan fluorescencia en las neuronas hipocampales.

2.5.1 Perfusión

Cuatro horas después de la última inyección correspondiente al PDI, los animales fueron anestesiados mediante inyección i.p de hidrato de cloral (0.1ml/100g) y posteriormente perfundidos transcardiacamente con solución lavadora (sacarosa 0,8%, NaCl 0,8% y glucosa 0,4%) y luego con paraformaldehído 4% en Buffer borato 0,2 M; pH 7,5. Los cráneos se dejaron durante toda la noche a 4°C cubiertos en papel aluminio para la protección de la fluorescencia contra la luz, luego se extrajeron los cerebros y se colocaron a 4 °C en sacarosa al 30% hasta su total impregnación.

2.5.2 Procesamiento del cerebro

Se realizaron cortes coronales de 40 μm , seriados cada 40 μm , en un criostato de congelación (Leica CM1850, Leica Biosystems, Germany) los cuales fueron montados en FluorSave TM (Calbiochem, San Diego, CA, EEUU) para microscopía confocal y almacenados a 4°C hasta la obtención de imágenes.

2.5.3 Microscopía confocal

Por cada animal, se obtuvieron entre 5-7 imágenes de dendritas terciarias y cuaternarias de neuronas piramidales del área hipocampal CA1 utilizando el Microscopio Confocal Zeiss LSM 800 (Centro de Micro y Nanoscopía de Córdoba, CEMINCO-CONICET-UNC) con un aumento de 63X, zoom de 2,5, paso en Z óptimo de 0,21 μm y un tamaño de imagen de 40,8 μm x 40,8 μm con un tamaño de píxel de 0,02 μm . Se tomaron imágenes de 3-4 animales por cada grupo experimental.

2.6 Análisis de la densidad y morfología de espinas dendríticas

Previo al análisis de imágenes, las mismas fueron deconvolucionadas utilizando el Software FIJI / Image J (National Institutes of Health) mediante el plugin DeconvolutionLab2 utilizando el algoritmo Richardson & Lucy. Posteriormente, las imágenes fueron procesadas (Figura 11) según la secuencia de pasos presentados a continuación; lo que permitió mejorar la resolución de las mismas y, así, facilitar su análisis manual:

1. "Subtract Background...", "rolling=50 sliding stack"
2. "8-bit"
3. "Remove Outliers...", "radius=1 threshold=50 which=Dark stack"
4. "Remove Outliers...", "radius=1 threshold=50 which=Bright stack"
5. for (i = 0; i < 10; i++)
6. "Erode (3D)", "iso=120"
7. "Median 3D...", "x=1 y=1 z=1"
8. "Red Hot"
9. "Subtract Background...", "rolling=100 sliding stack"

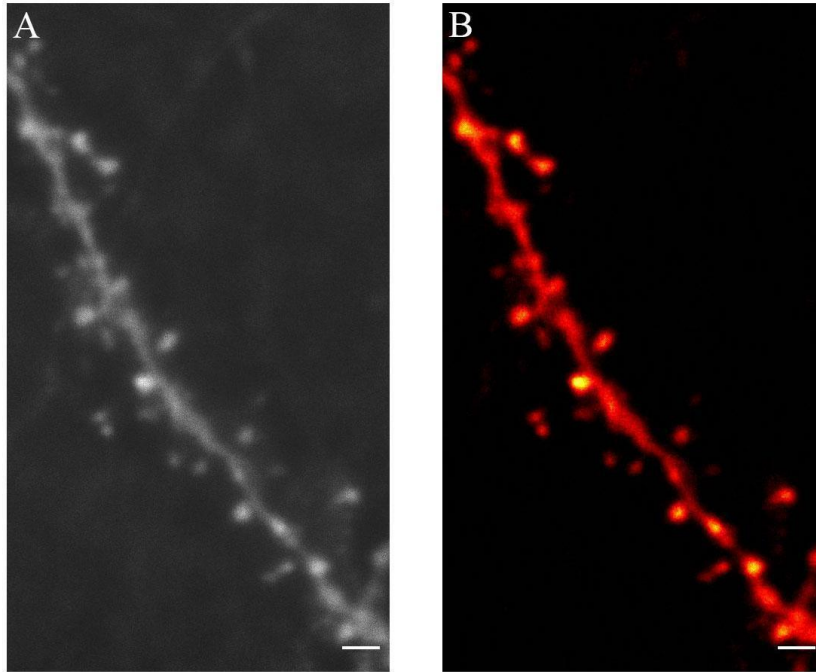


Figura 11. (A) Microfotografía deconvolucionada de una neurona hipocampal del área CA1 obtenida mediante microscopía confocal. (B) Microfotografía procesada mediante el Software Image J a partir de los parámetros establecidos. Barra de escala = 1 μm .

A partir de las imágenes obtenidas luego del procesamiento, se determinó la densidad de espinas cada 10 μm de dendrita, estableciendo un mínimo de 900-1000 μm analizadas para cada grupo experimental. Además, se realizó un análisis morfológico que permitió clasificar las espinas dendríticas en Stubby, Mushroom o Thin a partir de la medición de la longitud de cada espina (L), el diámetro de su cabeza (dh, de sus siglas en inglés) y el diámetro de su cuello (dn, de sus siglas en inglés) (Figura 12 A), parámetros establecidos por (Koh et al., 2002)) (Figura 12 B). Las mediciones de los parámetros y el análisis de la densidad y morfología de las espinas dendríticas se realizaron con fotos codificadas al azar; lo que garantizó un trabajo a ciegas por parte del experimentador.

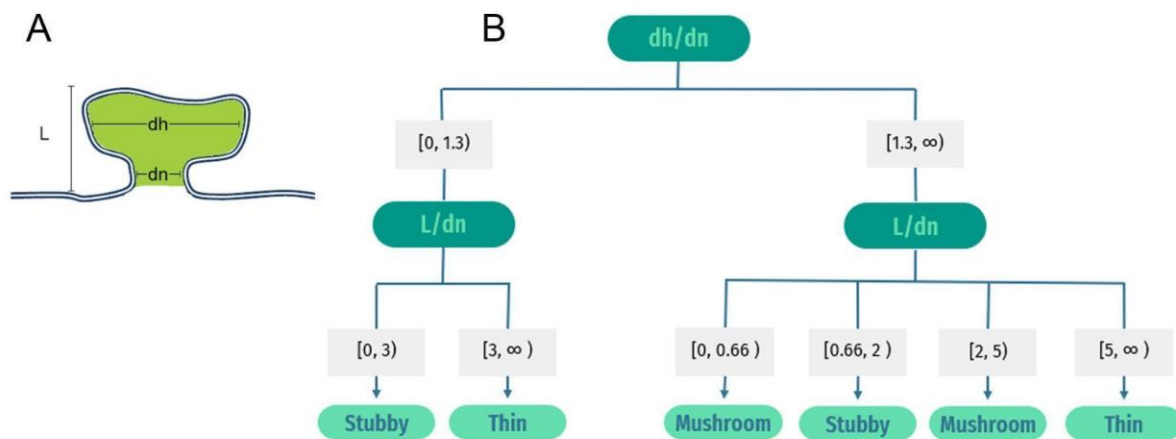


Figura 12. Criterios para la clasificación morfológica de las espinas dendríticas. (A) Espina Dendrítica: longitud de la espina dendrítica (L), diámetro de la cabeza (dh), diámetro del cuello (dn). Imagen adaptada de Qiao et al. (2016). (B) Parámetros establecidos para la clasificación morfológica de espinas dendríticas según Koh et al. (2002).

2.7 Análisis estadístico

Se realizó mediante el test T de Student o Análisis de la Varianza (ANOVA) a una o dos vías, evaluando el efecto de la interacción entre los factores, con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$). En los casos donde se encontró diferencias entre medias se aplicó un test a posteriori de Tukey o Sidak. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza se comprobaron con los test de Shapiro–Wilks modificado y Levene, respectivamente. Todos los análisis se realizaron utilizando el Software GraphPad Prism Versión 8.0.2 (GraphPad Software, Inc). Los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM) y el tamaño muestral (n) se especifica para cada experimento.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Sensibilización conductual asociada a la administración de anfetamina

Como primer objetivo del presente trabajo se propuso evaluar si existen diferencias sexuales en el mecanismo de sensibilización conductual provocada por la administración de Anf. Para esto se trabajó con ratones Thy-1 machos y hembras a PN 21-23, debido a que en estas edades los individuos se encuentran en la fase de hiato juvenil, es decir, presentan niveles bajos o inexistentes de esteroides, evitando así la exposición a sus efectos activadores. Para esto, se trabajó con un esquema de dos inyecciones en un contexto novedoso (campo abierto).

3.1.1 Actividad locomotora durante la habituación en Fase 1

Previo a la administración del tratamiento correspondiente (Sal o Anf), los animales fueron habituados al campo abierto durante 10 min con la finalidad de evaluar si presentan diferencias en las condiciones basales de locomoción. Los datos reflejaron que no existen diferencias en la distancia recorrida total entre los sexos durante el período de habituación (Figura 13), indicando que tanto machos como hembras presentan la misma respuesta locomotora basal.

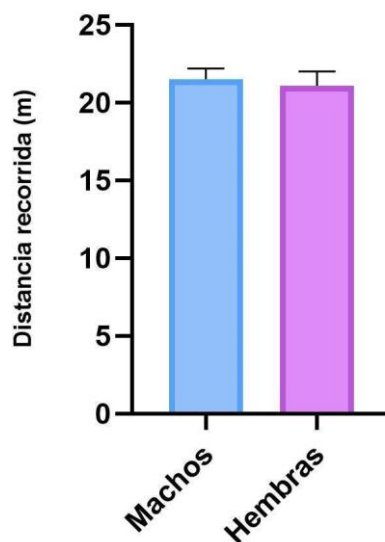


Figura 13. Registro de la actividad locomotora cuantificada como distancia recorrida en metros durante los 10 min analizados, correspondientes a la habituación de la fase 1. Los datos obtenidos se presentan como media \pm SEM. Test t para muestras independientes. n = 37-38 animales por grupo experimental.

3.1.2 Efecto agudo de anfetamina

Con el objetivo de evaluar la existencia de un efecto agudo inducido tras una primera exposición a Anf, se llevó a cabo el test conductual referido como Fase 1, el cual consistió en evaluar la actividad locomotora de machos y hembras a PN21 que se genera en respuesta a la administración del tratamiento y posterior exposición durante 60 min a un campo abierto (Figura 14). El análisis estadístico demostró la existencia de diferencias significativas en la actividad locomotora debido al tratamiento ($p < 0.0001$), sexo ($p = 0.0392$) y a su interacción ($p = 0.0246$). Este resultado permite afirmar que hubo un efecto agudo de la droga, ya que tras la primera exposición a Anf se produjo un incremento estadísticamente significativo en la actividad locomotora de los animales que recibieron la droga en comparación a sus respectivos controles que recibieron Sal ($p < 0.05$). A su vez, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las hembras que recibieron Anf con respecto a los machos que recibieron Anf, reflejándose una mayor locomoción en las hembras, dejando en evidencia que la respuesta aguda a la administración de Anf es un mecanismo dependiente del sexo ($p = 0.0101$) (Figura 14).

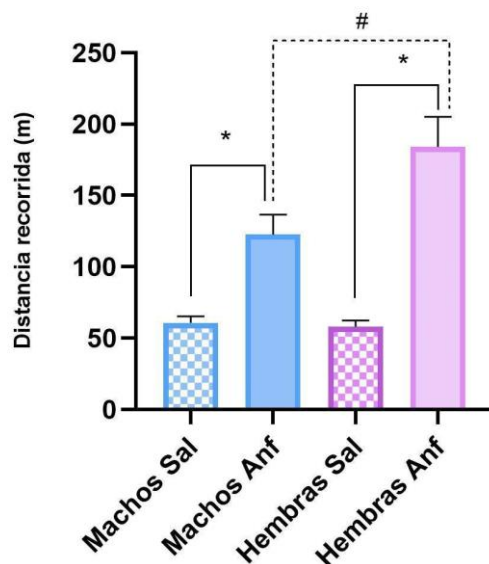


Figura 14. Registro de la actividad locomotora de machos y hembras PN 21 cuantificada como distancia en metros durante los 60 min analizados correspondientes a la fase 1. Los datos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías, incluyendo las variables tratamiento (Sal, Anf) y sexo (macho, hembra) y test *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$ Sal vs. Anf; # $p = 0.0101$ machos Anf vs. hembras Anf. $n = 22-25$ animales por grupo experimental.

Sumado a esto, y con el fin de evaluar si el efecto de hiperlocomoción producido por la droga se corresponde con los patrones reportados en la bibliografía (Mlewski et al., 2016), se

realizó un análisis de la actividad locomotora en bloques de 5 min obteniendo diferencias estadísticamente significativas en las variables sexo ($p < 0.0001$), tiempo ($p < 0.0001$) y en su interacción ($p < 0.0001$). Las diferencias entre los animales que recibieron Anf con respecto a los que recibieron Sal se evidencian a partir de los 20 min ($p < 0.05$), manteniéndose hasta el final del test. Por otro lado, la diferencia entre sexos se observa en el bloque temporal de 55 a 60 min ($p = 0.0261$) (Figura 15).

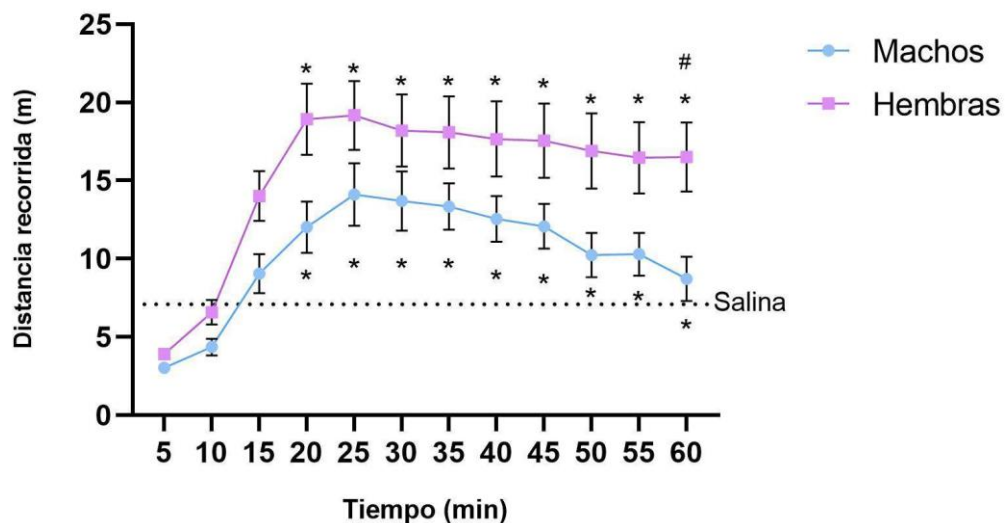


Figura 15. Registro de la actividad locomotora evaluada en bloques de 5 min inducida por el tratamiento agudo con Anf, cuantificada como distancia en metros durante los 60 min analizados correspondientes a la fase 1. Los datos obtenidos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, incluyendo las variables sexo (machos, hembras) y tiempo (bloques de 5 min) y test *post hoc* de Sidak. * $p < 0.05$ Sal vs. Anf; # $p = 0.0261$ machos Anf vs. hembras Anf. $n = 22-25$ animales por grupo experimental.

3.1.3 Sensibilización conductual en respuesta a la administración de Anf

Con la finalidad de evaluar la existencia de sensibilización a los efectos de Anf, luego de un día de abstinencia, machos y hembras PN 23 fueron administrados nuevamente con Sal o Anf y se registró su actividad locomotora, quedando así definidos 8 grupos experimentales: machos Sal-Sal, machos Sal-Anf, machos Anf-Sal, machos Anf-Anf, hembras Sal-Sal, hembras Sal-Anf, hembras Anf-Sal y hembras Anf-Anf. Los datos obtenidos corresponden a la cuantificación de la actividad locomotora durante los 60 min de la fase 2 (Figura 16). El análisis estadístico indicó la existencia de diferencias significativas debido al tratamiento ($p < 0.0001$) y a la interacción sexo \times tratamiento ($p = 0.0384$). Los machos que recibieron Anf

en la fase 2 (Sal-Anf, Anf-Anf) mostraron una actividad locomotora significativamente mayor que los que recibieron Sal (Sal-Sal, Anf-Sal) ($p < 0.05$). De manera interesante, los machos no mostraron sensibilización conductual a los efectos estimulantes de Anf (Figura 16).

Por otro lado, las hembras que recibieron dos dosis de Anf (Anf-Anf) exhibieron un incremento significativamente mayor en la actividad locomotora respecto a aquellas que recibieron una sola dosis de Anf en la fase 2 (Sal-Anf) indicando que las hembras presentan sensibilización conductual, es decir, un incremento progresivo y persistente de la hiperlocomoción producida por la exposición repetida a Anf ($p = 0.0018$). Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) en la locomoción de las hembras que recibieron Sal en la fase 2 (Sal-Sal, Anf-Sal) respecto a aquellas que recibieron dos dosis de Anf (Anf-Anf) (Figura 16).

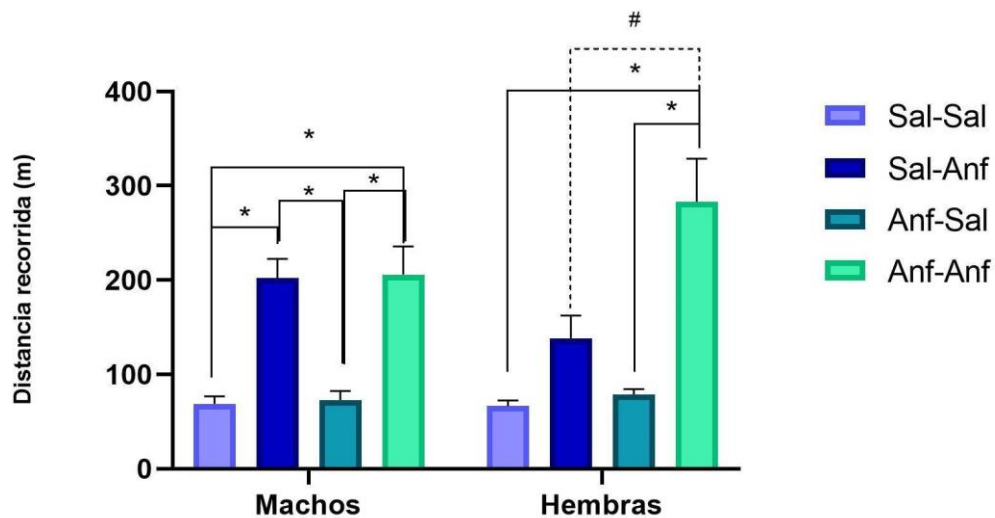


Figura 16. Registro de la actividad locomotora de machos y hembras PN 23, cuantificado como distancia en metros durante los 60 min analizados correspondientes al test de la fase 2. Los datos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías, incluyendo las variables tratamiento (Sal-Sal, Sal-Anf, Anf-Sal, Anf-Anf) y sexo (macho, hembra) y test *post hoc* de Tukey. # $p < 0.0010$ Hembras Sal-Anf vs. hembras Anf-Anf. $n = 11-14$ animales por grupo experimental.

El análisis de la actividad locomotora de machos en bloques de 5 min demostró diferencias estadísticamente significativas en el factor tiempo ($p < 0.0001$), tratamiento ($p < 0.0001$) y en la interacción tiempo x tratamiento ($p < 0.0001$). Los machos Anf-Anf presentaron mayor actividad locomotora respecto a Sal-Anf solo durante los primeros 15 min de la prueba ($p < 0.05$) (Figura 17).

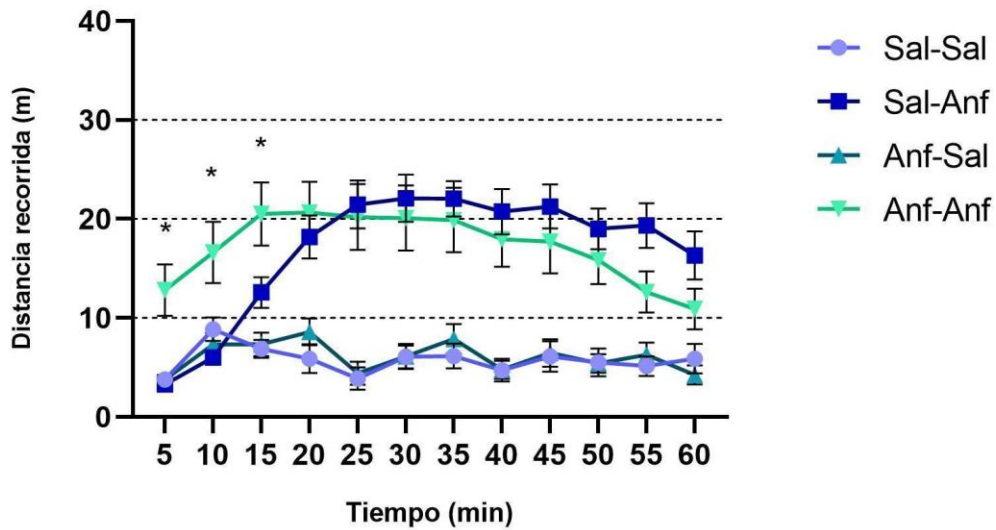


Figura 17. Registro de la actividad locomotora de machos PN 23 cuantificada como distancia en metros durante los 60 min analizados correspondientes a la fase 2, esta respuesta conductual fue evaluada en bloques de 5 min. Los datos obtenidos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, incluyendo las variables tratamiento (Sal-Sal, Sal-Anf, Anf-Sal, Anf-Anf) y tiempo y test *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$ Sal-Anf vs. Anf-Anf. $n = 10-11$ animales por grupo experimental.

Por otra parte, las hembras mostraron diferencias estadísticamente significativas para el factor tiempo ($p = 0.0198$) y tratamiento ($p < 0.0001$). Los resultados arrojaron diferencias entre las hembras Sal-Anf y Anf-Anf 10 min después de la administración de la droga, diferencia que se mantuvo hasta el final de la prueba ($p < 0.05$) (Figura 18).

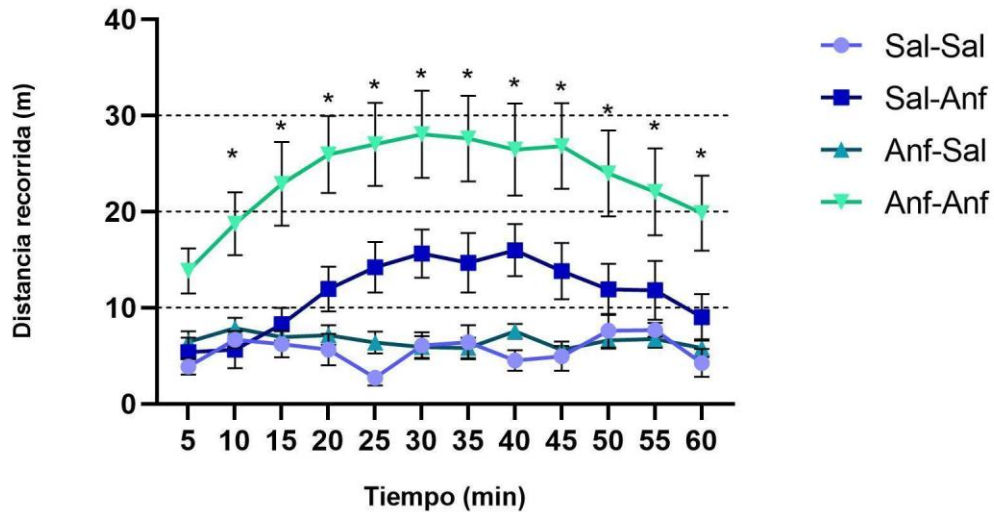


Figura 18. Registro de la actividad locomotora de hembras PN 23 cuantificada como distancia en metros durante los 60 min analizados correspondientes a la fase 2, esta respuesta conductual fue evaluada en bloques de 5 min. Los datos obtenidos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías con medidas repetidas, incluyendo las variables tratamiento (Sal-Sal, Sal-Anf, Anf-Sal, Anf-Anf) y tiempo y test *post hoc* de Tukey. Tiempo ($p = 0.0198$), tratamiento ($p < 0.0001$). * $p < 0.05$ Sal-Anf vs. Anf-Anf. $n = 8-11$ animales por grupo experimental.

3.2 Diferencias sexuales en la densidad y morfogénesis de espinas dendríticas

Con la finalidad de estudiar la plasticidad sináptica estructural en el hipocampo asociada a la administración de Anf, se propuso como segundo objetivo del presente trabajo evaluar si existen diferencias sexuales tanto en la densidad como en la morfogénesis de espinas dendríticas en neuronas piramidales del área hipocampal CA1 en ratones Thy-1 machos y hembras a PN 23. Para esto, se obtuvieron microfotografías de la zona de interés (Figura 19) y se evaluó la densidad y la forma de las espinas dendríticas para clasificarlas en Stubby, Mushroom o Thin, según los parámetros establecidos en Koh et al. (2002).

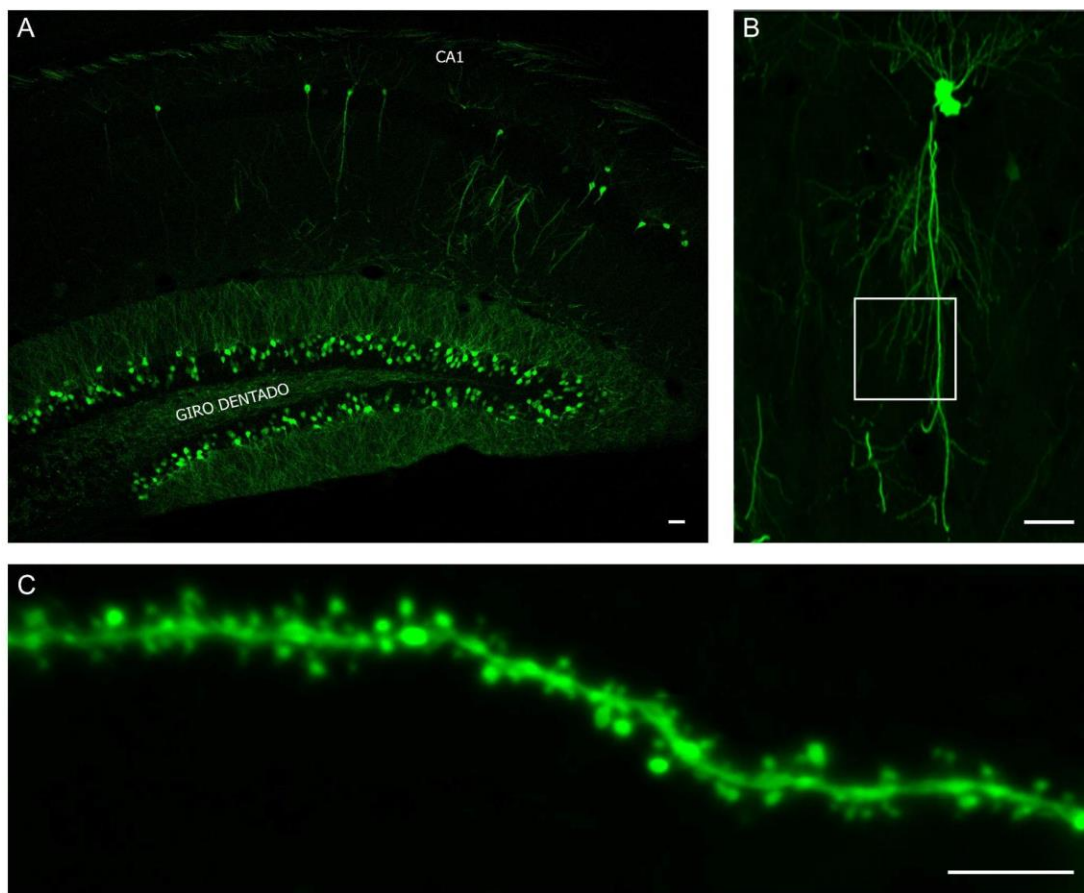


Figura 19. Microfotografías de neuronas hipocámpales tomadas mediante microscopía confocal. **(A)** Hipocampo, mostrando el Giro dentado y CA1. **(B)** Neurona piramidal en la cual se visualizan dendritas secundarias, terciarias y cuaternarias. **(C)** Segmento de neurita hipocámpal del área CA1 en el cual se visualizan diversas morfologías de espinas a lo largo del eje dendrítico. Barra de escala= 30 μ m.

3.2.1 Densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocámpales del área CA1

A partir de estudios previos, se sabe que el tratamiento con Anf produce un aumento de la densidad de espinas dendríticas (Ferrerías et al., 2017); además, las hormonas esteroideas también se encuentran íntimamente relacionadas a este proceso de espinogénesis (Akama et al., 2013; Rune & Frotscher, 2005). Con motivo de evaluar si existen diferencias dependientes del sexo, se analizó la densidad de espinas dendríticas tanto en machos como en hembras en respuesta al tratamiento con Anf. A partir de los datos analizados, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para la variable sexo ($p = 0.0051$), observándose una mayor densidad de espinas dendríticas en machos con respecto a hembras; independientemente del tratamiento recibido (Figura 20).

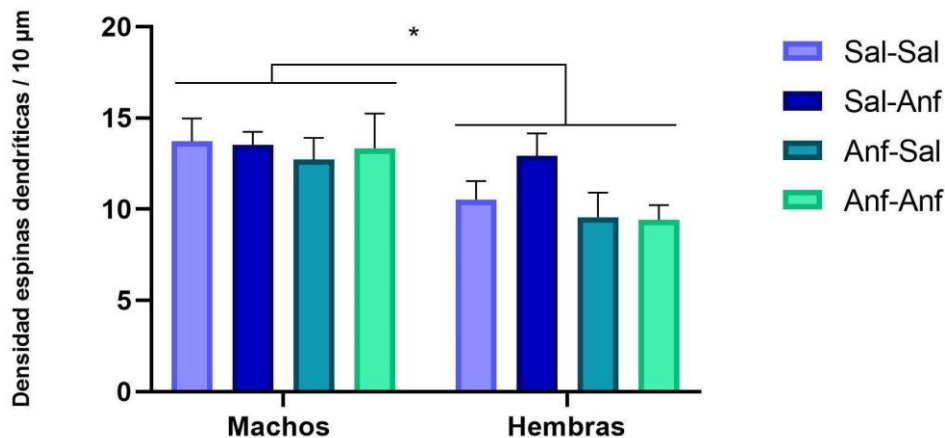


Figura 20. Densidad de espinas dendríticas cada 10 μm en machos y hembras. Los datos obtenidos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías, incluyendo las variables tratamiento (Sal-Sal, Sal-Anf, Anf-Sal, Anf-Anf) y sexo (machos, hembras). * $p < 0.05$ machos vs. hembras. $n=4$ animales por grupo experimental.

3.2.2 Morfología de espinas dendríticas de neuronas hipocampales del área CA1

Las espinas dendríticas presentan diversos tipos de morfología, cada una correspondiente a un grado de maduración. Estudios afirman que la administración repetida de psicoestimulantes modifica la morfología dendrítica (Ferrerías et al., 2017), por lo que se propuso evaluar si existen diferencias sexuales en la morfología de las espinas en respuesta al tratamiento con Anf. Los resultados obtenidos mostraron mayor número de espinas tipo Stubby en machos respecto a hembras, se obtuvo un valor de p para la variable sexo estadísticamente significativo ($p=0.0293$), independientemente del tratamiento con Anf (Figura 21 A). Con respecto al análisis de las espinas tipo Thin, se encontró interacción entre los factores sexo x tratamiento ($p=0.0484$), siendo que estas fueron mayores en hembras que recibieron Anf (Sal-Anf) con respecto a los machos que recibieron el mismo tratamiento ($p=0.0427$) (Figura 21B). Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de espinas Mushroom (Figura 21C).

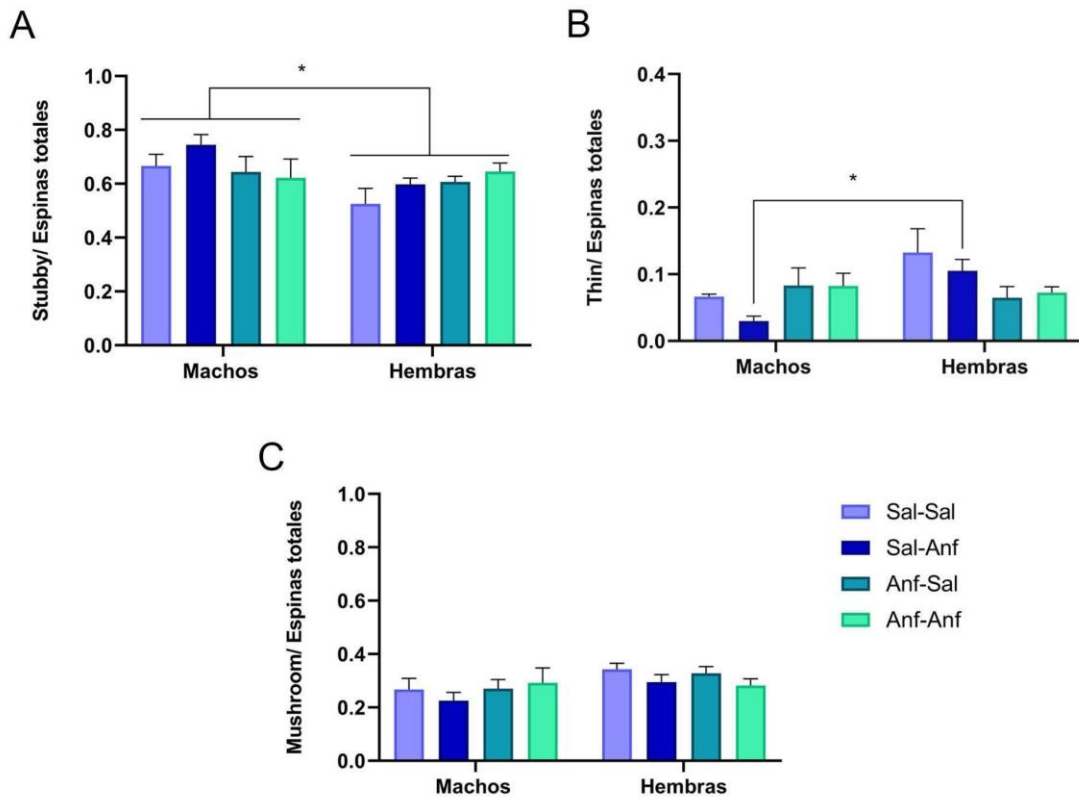


Figura 21. Proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas de machos y hembras PN 23 **(A)** Stubby. **(B)** Thin. **(C)** Mushroom. Los datos se presentan como media \pm SEM. ANOVA de dos vías, incluyendo las variables tratamiento (Sal-Sal, Sal-Anf, Anf-Sal, Anf-Anf) y sexo (machos, hembras) y test *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$. $n=4$ animales por grupo experimental.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La presente tesina de grado tuvo como finalidad evaluar la existencia de diferencias sexuales en el desarrollo de los fenómenos de hiperlocomoción por administración aguda y sensibilización en respuesta a la administración de la droga psicoestimulante Anf, implementando un protocolo de dos inyecciones en machos y hembras pre-adolescentes (PN 21-23). Además, se estudió la espinogénesis y morfogénesis de espinas dendríticas en el área hipocampal CA1, nodo cerebral que se encuentra relacionado con el consumo de drogas y cuya plasticidad se modifica de manera dependiente del sexo (Yagi & Galea, 2019).

4.1 La respuesta aguda a la administración de anfetamina es un mecanismo dependiente del sexo en ratones PN 21

Múltiples estudios han demostrado que existen diferencias dependientes del sexo en el proceso de adicción a drogas, tanto en comportamientos relacionados a su búsqueda, como en las respuestas que se dan luego del consumo (Santos-Toscano et al., 2023). Esta respuesta desigual entre machos y hembras se da en comportamientos tales como la motivación para obtener una droga específica, los niveles de ingesta o la propensión a reiniciar el comportamiento de búsqueda después de un período de abstinencia; diferencias que también son observables en respuestas conductuales tales como la actividad motora (revisado en Fattore et al., 2008). En relación con esto, se ha demostrado que las hembras muestran una progresión más rápida que los machos para convertirse en abusadoras de sustancias después de su primer consumo a pesar de las consecuencias adversas (Ait-Daoud et al., 2019; Bobzean et al., 2014; Greenfield et al., 2010). Se postula que el E2, la progesterona y los andrógenos contribuyen a las diferencias sexuales en el proceso de adicción a sustancias debido a sus niveles de dimorfismo sexual, ya que sus valores cambian en periodos vitales críticos y en condiciones fisiológicas como la adolescencia o el ciclo menstrual (Joyce et al., 2021). Múltiples estudios sugieren que estas diferencias son causadas por la presencia del ciclo estral en las hembras, ya que a partir de la administración de estrógenos y ovariectomía se observaron respuestas diferenciales en el comportamiento de las mismas, determinando así el importante rol que tienen las hormonas en las diferencias sexuales durante el consumo de drogas (Carroll et al., 2004; W. Lynch et al., 2002; Roth et al., 2004). Cabe destacar que en nuestros experimentos utilizamos animales (PN 21) que solo han estado expuestos al pico de T perinatal, con el objetivo de evaluar los efectos organizacionales de las hormonas gonadales sobre la actividad locomotora mediada por Anf.

El cerebro es uno de los principales sitios de interacción hormonal, y es concebible que los esteroides y las hormonas ováricas alteran directamente la neurotransmisión (Fink et al., 1996). Se sabe que el estrógeno ejerce efecto sobre el estado de ánimo, el estado mental y la memoria, ya que actúa sobre los mecanismos transmisores de monoaminas tales como la DA; por lo que es esperable que los niveles hormonales modulen las respuestas conductuales generadas por fármacos dopaminérgicos. En general, el E2 eleva y la progesterona reduce la actividad dopaminérgica en las hembras que consumen sustancias, mientras que la T y la progesterona aumentan la conducta patológica de consumo y búsqueda de drogas en machos (Santos-Toscano et al., 2023). Es así como la Anf puede producir efectos diferenciales en machos y hembras, donde la respuesta de las hembras varía a lo largo del ciclo estral (Becker et al., 2001). En relación con esto Lynch et al. (2007) demostró que cuando se alcanzan niveles más altos de E2, durante la fase de celo, las ratas hembra adolescentes muestran niveles mayores de consumo de cocaína y adquieren conductas de autoadministración más fácilmente y en un porcentaje mayor en comparación con los machos (Lynch, 2007). Otros estudios demuestran que la exposición a T durante la adolescencia atenúa la locomoción inducida por Anf en ratas (PN 45) (Purves-Tyson et al., 2015). En relación a esto, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con esta información previa, ya que los mismos evidencian que, si bien la administración de Anf genera un aumento en la respuesta locomotora correspondiente a una mayor liberación de DA, se observó que una única administración de Anf es suficiente para generar un incremento sexualmente dimórfico en la actividad locomotora (Figuras 14 y 15), ya que en las hembras se observó una respuesta aguda significativamente mayor que en los machos. La disminución de la locomoción en los machos podría ser explicada por las acciones organizacionales de la T durante el período crítico del desarrollo.

4.2 La administración de anfetamina bajo un protocolo de dos inyecciones resulta en la sensibilización conductual de hembras PN 23

La sensibilización conductual se define como el incremento progresivo y persistente de un efecto producido por la exposición repetida a una droga psicoestimulante (Gatica et al., 2020). Se sabe que el proceso de sensibilización depende de diversas variables, tales como el ambiente, la forma de administración de la droga, variantes individuales, edad y sexo. El ambiente es una variable clave que actúa en la modulación de este fenómeno, ya que se lo relaciona con la generación de neuroadaptaciones que impulsan el desarrollo de patrones

compulsivos de búsqueda y consumo de la droga (Crombag et al., 1996). Se ha propuesto que el estímulo contextual que otorga el ambiente no actúa solo como un excitador tradicional para producir una respuesta condicionada, sino que actuaría como una clase diferente de estímulo condicionado conocido como modulador ocasional, donde modulan la respuesta de la droga aun sin producir una respuesta condicionada (Anagnostaras & Robinson, 1996). Numerosos estudios han demostrado también que la novedad del contexto donde se desarrolla la sensibilización juega un papel importante en el desarrollo de este proceso (Anagnostaras & Robinson, 1996). Por ejemplo, se ha encontrado que repetidas pre-habituaciones al ambiente donde se realizará la prueba altera la respuesta aguda a Anf (Bardo et al., 1990). Otros autores han encontrado, además, que el contexto novedoso puede potenciar los efectos activadores psicomotores de esta droga (Badiani et al., 1998; Mlewski et al., 2016). La sensibilización inducida por el consumo de drogas de abuso también está modulada por variables temporales, ya que se ha demostrado que la expresión de la sensibilización es más evidente cuando la administración de la droga ocurre entre intervalos de un día o más, aumentando la actividad locomotora o la estereotipia progresivamente con cada administración (Berke & Hyman, 2000); mientras más largo es el periodo de abstinencia, más se favorece este fenómeno (Antelman et al., 1988).

Otras investigaciones proponen la existencia de diferencias a nivel individual en la susceptibilidad a desarrollar sensibilización, debido a factores genéticos, hormonales o propiamente experimentales. Se ha estudiado cómo varía esta predisposición en función a la edad; estudios en adolescentes muestran que la susceptibilidad a la sensibilización inducida por drogas psicoestimulantes es mayor que en animales adultos (Belluzzi et al., 2004; Schramm-Sapyta et al., 2004), mientras que otros autores han encontrado resultados contrarios (Collins & Izenwasser, 2004; Laviola et al., 1995). Dentro de individuos del mismo grupo etario también se ha descrito la existencia de diferencias individuales en la susceptibilidad a la sensibilización, ya que algunos animales muestran una adquisición más rápida y sensibilización más robusta con una dosis dada de droga, mientras que, en respuesta al mismo tratamiento, este proceso no se desarrolla en otros individuos (Robinson, 1988).

Con respecto a la dosis o el patrón de administración de la droga, se sabe que tratamientos repetidos con dosis moderadas de drogas son más efectivos para inducir sensibilización en comparación con exposiciones a altas dosis o dosis escalonadas (Robinson & Berridge, 1993; Vanderschuren & Kalivas, 2000; Vezina & Leyton, 2009). Además, administraciones repetidas de drogas de abuso disparan respuestas bioquímicas y celulares diferentes a aquellas inducidas por una sola exposición. Con relación a esto, Valjent y

colaboradores (2010) desarrollaron el denominado **protocolo de inducción de sensibilización de dos inyecciones (PDI)**, donde el efecto de sensibilización en este tipo de esquema queda evidenciado después de una segunda inyección (Valjent et al., 2010). En relación a esto, se ha demostrado que la sensibilización a Anf bajo el mencionado protocolo se manifiesta principalmente cuando los animales son entrenados y evaluados en un ambiente novedoso (Mlewski et al., 2016); sin embargo, esta investigación previa evaluó el efecto solo en ratas macho adolescentes (PN 33-35). En otro estudio, Gatica y colaboradores observaron que no todos los sujetos experimentales a los que se les aplica repetidamente drogas de abuso desarrollan adicción, utilizando ratas macho adultos los cuales fueron administrados repetitivamente Anf se observó que un porcentaje de los animales no sensibilizaron. Los resultados mostraron que los animales que expresaron sensibilización presentaron un aumento en la actividad locomotora que se correspondió con un incremento en los niveles basales del neurotransmisor DA en el cuerpo estriado dorsolateral (Gatica et al., 2020).

Con la intención de estudiar el valor que tiene la variable sexo en el proceso de sensibilización conductual, nos propusimos evaluar este fenómeno en animales machos y hembras pre-adolescentes (PN 21-23) que solo han estado expuestos a los efectos organizacionales de los esteroides gonadales. Los resultados obtenidos dejaron en evidencia que, bajo la aplicación del PDI asociado a un contexto novedoso, existe dimorfismo sexual en el proceso de sensibilización, ya que sólo las hembras que recibieron doble administración de Anf (Anf-Anf) exhibieron un incremento significativamente mayor de su actividad locomotora respecto a aquellas que recibieron una sola administración de la droga (Sal-Anf) (Figura 16). El efecto del psicoestimulante también fue evaluado en el tiempo, estos resultados revelaron que no solo se genera un incremento de la actividad locomotora en las hembras, sino que el mismo se sostuvo hasta la finalización de la prueba, lo cual se corresponde con este tipo de fenómeno conductual (Figura 18). Por otro lado, si bien los machos reflejaron una mayor actividad locomotora con la administración de Anf, no se observó el fenómeno de sensibilización conductual, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los individuos que recibieron dos dosis de Anf (Anf-Anf) con respecto a los que recibieron una única dosis en la fase 2 (Sal-Anf). Relacionado a esto, estudios previos demuestran que la sensibilización conductual en respuesta a psicoestimulantes se expresa tanto machos como hembras, pero las hembras muestran un mayor aumento de los movimientos de rotación y los comportamientos estereotipados respecto a los machos. Se sabe que la sensibilización está regulada por el E2 circulante en las hembras, y que la misma varía en respuesta a la variación hormonal durante el ciclo estral; efecto que no se observa en los machos, ya que las hormonas

testiculares no regulan este proceso (Quigley et al., 2021). Debido a que en nuestro estudio los animales se encuentran en una etapa de hiato juvenil o pre-adolescencia, en la cual la presencia de hormonas gonadales es prácticamente nula o inexistente, el E2 que modula el fenómeno de sensibilización conductual en hembras podría ser el proveniente de la síntesis local del cerebro. Se sabe que los neuroesteroides se encuentran en el cerebro aún luego de la gonadectomía, lo que indica que son sintetizados *de novo* o a partir de precursores endógenos y por enzimas que están presentes en el SNC; específicamente, se ha demostrado que la proteína reguladora de la esteroidogénesis y la aromatasas, dos moléculas esenciales para la síntesis de estrógenos, se expresan en el hipocampo (Rune & Frotscher, 2005). Además, se ha encontrado que la cantidad de E2 derivado de cultivos neuronales hipocampales es considerablemente más alta que la presente en el suero de los animales, siendo que el estrógeno del hipocampo es aproximadamente tres veces más en hembras y cuatro veces en cultivos de machos, en comparación al plasma (Rune & Frotscher, 2005). En relación a esto, un estudio de Konkle y McCarthy reveló que los niveles de E2, T y DHT no presentan diferencias sexuales en el hipocampo de ratas a lo largo del desarrollo (PN 0-60) (Konkle & McCarthy, 2011). Sin embargo, la diferencia de la actividad del E2 puede darse por una distribución desigual de sus receptores según el sexo.

Por otro lado, el consumo de drogas psicoestimulantes puede desatar otro fenómeno conocido como tolerancia, el cual se caracteriza por mostrar una respuesta locomotora reducida tras el consumo repetido de la droga (Berke & Hyman, 2000), de modo que se requiere de mayores dosis posteriores para conseguir el mismo efecto (Robledo, 2008). Este tipo de fenómeno podría ser el que se refleja con los datos de los machos en nuestro estudio.

Es de amplio conocimiento que las diferencias sexuales en el cerebro se corresponden con dos principales factores, el efecto de las hormonas sexuales y el de los cromosomas sexuales, además de las posibles interacciones que puede haber entre ambos (Arnold, 2017). Para evaluar puntualmente el efecto de las hormonas sexuales, como estudio a futuro se podría trabajar con hembras masculinizadas durante periodo crítico (PN 0-1) a partir de la administración de T o su metabolito aromatizado, el E2. Así, se activarían los mismos perfiles de expresión génica y cascadas de señalización celular que ocurre normalmente en machos (McCarthy et al., 2017), lo que permitiría determinar el rol de las hormonas sexuales en el proceso de sensibilización conductual, ya que si las hembras masculinizadas responden de manera diferencial a las hembras control, se podría afirmar que las hormonas desempeñan un papel clave en este proceso, de lo contrario, podría deberse a la acción del complemento cromosómico. Otro estudio a futuro que se podría proponer para dilucidar las causas de esta

respuesta diferencial dependiente del sexo sería utilizar el modelo murino transgénico de los cuatro genotipos o “Four Core Genotypes”. Una gran cantidad de investigaciones utilizan esta herramienta para demostrar que múltiples diferencias sexuales en el cerebro y en el comportamiento pueden atribuirse al complemento cromosómico en lugar del fenotipo gonadal. Este modelo se basa en una línea de ratón que fue modificada genéticamente, donde se generaron individuos XX con testículos por la inserción del transgen Sry en un autosoma e individuos XY con ovarios por la delección del gen Sry, separando así el genotipo sexual y el fenotipo gonadal. En este modelo, los individuos que heredan un cromosoma X, un cromosoma Y- (sin el gen *Sry*) y el gen Sry reinserto en el cromosoma 3 (designados XY-Sry), desarrollan testículos y en la adultez son machos fértiles. Al cruzar estos machos XY-Sry con hembras normales XX, es posible obtener los cuatro genotipos diferentes que dan nombre al modelo: hembras XX (XXh), hembras XY- (XYh), machos XY-Sry (XYm) y machos XX-Sry (XXm) (Cabrera Zapata et al., 2022; Cambiasso et al., 2017; McCarthy et al., 2017). Debido a lo expuesto anteriormente, la aplicación del PDI a animales del FCG permitirá evaluar si las diferencias sexuales encontradas en el fenómeno de sensibilización conductual se deben al sexo gonadal (testículos/ovarios y el ambiente hormonal asociado a cada tipo de gónada), al sexo genético o cromosómico (complemento cromosómico sexual XY/XX) o la interacción entre estos dos factores (Cabrera Zapata et al., 2022).

4.3 La espinogénesis de neuronas hipocampales del área CA1 es un proceso sexualmente dimórfico

La plasticidad sináptica estructural es el proceso por el cual se forman y/o eliminan sinapsis (Holtmaat & Svoboda, 2009); proceso que puede variar con la edad, la región del cerebro y las condiciones experimentales (Sorra & Harris, 2000). Las espinas dendríticas son *per se* sitios donde ocurren fenómenos de plasticidad sináptica, a su vez, se sabe que el consumo de drogas también trae aparejado el fenómeno de neuroplasticidad; por lo que dilucidar los mecanismos que subyacen a la regulación de la densidad de espinas dendríticas y las diferentes variables que lo regulan, tales como las sustancias psicoestimulantes o las variables establecidas por el sexo, proporcionan un modelo valioso para establecer una relación entre las modificaciones de los patrones sinápticos y ciertos fenómenos comportamentales. En relación con esto, el presente trabajo permitió evaluar la espinogénesis de estas estructuras dinámicas en respuesta a la administración de Anf en áreas específicas del sistema de recompensa,

particularmente en el hipocampo, aportando así ciertos indicios de cómo funciona el fenómeno de plasticidad en relación con la variable sexual.

En cuanto al sexo como variable generadora de cambios, se sabe que las espinas dendríticas exhiben cambios dinámicos en número, tamaño y forma en respuesta a la variación del estado hormonal y la etapa de desarrollo (Amateau & McCarthy, 2002). Se ha demostrado que el E2 es un potente regulador de las espinas dendríticas y de las sinapsis que ocurren en varios nodos cerebrales durante el desarrollo y la adultez (Amateau & McCarthy, 2002). Además, esta hormona es de gran importancia ya que es capaz de inducir efectos permanentes sobre el sustrato neuronal en desarrollo, sobre todo en el establecimiento de patrones sinápticos sexualmente dimórficos, sin embargo, los mecanismos por los cuales esto ocurre siguen siendo prácticamente desconocidos (Amateau & McCarthy, 2002). Se han realizado múltiples estudios que evalúan la acción del E2 en la pubertad, es decir, el efecto activacional que este tiene sobre los circuitos neurales; por ejemplo Woolley y colaboradores (1990) fueron los primeros en demostrar que la densidad de las espinas dendríticas varía durante el ciclo estral de las hembras, observaron que existían fluctuaciones cíclicas en la densidad de las espinas dendríticas las cuales correlacionaban con la variación de los niveles de E2 y progesterona a lo largo del ciclo estral de las hembras adultas. También observaron que la ovariectomía en ratas hembra resultó en una disminución de la densidad de las espinas dendríticas del hipocampo; efecto que fue rescatado a partir de la administración de E2 (Woolley et al., 1990). La ciclicidad entre la densidad de espinas dendríticas y las hormonas fue observada específicamente en el hipocampo; relación que no se observó en otras áreas cerebrales tales como la neocorteza y el cerebelo. Sin embargo, en cultivos de cortes de hipocampo de adultos encontraron que la densidad de espinas dendríticas no se encontraba influenciada por la aplicación de E2 independientemente del sexo de los animales que proporcionan el tejido (Fester et al., 2012), este hallazgo interfiere con la correlación frecuentemente demostrada entre los cambios cíclicos en el nivel de E2 en plasma y la densidad de sinapsis de las espinas. Por otro lado, a partir de los mismos cultivos demostraron que la inhibición de la actividad de la aromatasa ocasionó la pérdida de sinapsis de las espinas (Fester et al., 2012). En resumen, estos datos sugieren que el E2 producido localmente en lugar del originado en los ovarios regula la densidad de sinapsis de las espinas. Sin embargo, la comparación de la densidad de sinapsis de espinas entre ratones macho y hembra *in vivo* mostró una clara diferencia específica del sexo, siendo que la densidad de sinapsis de espinas dendríticas en los machos era similar a la densidad en las hembras ovariectomizadas, mientras que era dos veces mayor en las hembras cíclicas intactas (Fester et al., 2012). Además, observaron que la inhibición de la aromatasa en hembras

induce la pérdida de las sinapsis que se llevan a cabo en espinas dendríticas hipocampales, este efecto no fue observado en machos; por lo que los autores proponen que esta diferenciación está relacionada con el ciclo estral que poseen las hembras y su regulación a partir de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual modera los niveles de síntesis de E2 en el hipocampo (Fester et al., 2012).

El efecto del E2 varía a nivel de las estructuras cerebrales, en íntima relación con el sexo y la etapa del desarrollo, así, varios experimentos han demostrado que la frecuencia de las sinapsis de las espinas dendríticas puede ser dos veces mayor en algunas regiones del cerebro masculino en comparación con la del cerebro femenino y, sin embargo, ser exactamente lo opuesto en una región adyacente (Amateau & McCarthy, 2002). Por ejemplo, se ha demostrado que el E2 modula el crecimiento de las espinas dendríticas en el núcleo arcuato, siendo que los machos presentan la mitad del número de espinas dendríticas en sus neuronas en comparación con las hembras, diferencia sexual que depende de una cantidad elevada de E2 en el cerebro de machos durante el período sensible perinatal (Matsumoto & Arai, 1986). Por otro lado, la exposición a E2 durante el período crítico de desarrollo orquesta patrones sinápticos sexualmente dimórficos permanentes en regiones del hipotálamo, mientras que la exposición pospuberal de esta hormona controla los cambios dinámicos en la densidad de las espinas en regiones tales como el hipocampo e hipotálamo (Amateau & McCarthy, 2002). En los estudios de Bruce McEwen y colaboradores (2002) se ha demostrado que la administración de E2 a ratas ovariectomizadas conduce a un aumento de espinas en las dendritas apicales de las neuronas del hipocampo en la región CA1 (McEwen, 2002; Rune & Frotscher, 2005). Fester y colaboradores (2021) también resaltan la existencia de una dependencia sexual en la plasticidad sináptica regulada a partir del E2. En su investigación, observaron que, en el hipocampo de machos, la inhibición de la síntesis de E2 no tiene ningún efecto sobre el número de sinapsis y la LTP, siendo la T y su metabolito DHT el esteroide sexual que toma un papel clave en la regulación de la plasticidad sináptica en este sexo. Por otro lado, en el hipocampo de hembras, el E2 que es sintetizado localmente mantiene la conectividad de esta área cerebral, siendo que la inhibición de la síntesis de este neuroesteroide da como resultado una disminución en la densidad de espinas dendríticas, en la densidad de la sinapsis que se produce en estas, la expresión de proteínas sinápticas observada en ratones *in vivo* y en cultivos de cortes de hipocampo de rata, y una LTP alterada en cortes y cultivos de hipocampo, todos efectos que podrían ser rescatados por el E2 (Fester & Rune, 2021). Los cultivos utilizados en esta investigación se originaron a partir de fetos (E18-19) que han estado expuestos *in utero* al pico de T producido por los testículos, por lo que estas diferencias podrían deberse a la acción

directa de los genes de los cromosomas sexuales o indirectamente a la secreción de T fetal durante el período crítico perinatal, cuando tiene lugar la masculinización del cerebro (Brandt et al., 2020).

Con respecto al presente trabajo de tesina, se encontraron diferencias sexuales a PN 23 en la densidad de espinas dendríticas hipocampales, siendo este parámetro mayor en machos respecto a hembras. Como se mencionó anteriormente, estudios revelan que, en los machos, el proceso de espinogénesis es regulado por la T o la DHT (Fester & Rune, 2021), esto sumado al hecho de que los animales empleados en este trabajo se encontraban en PN 23 (etapa de hiato juvenil), permite pensar que el esteroide que actúa regulando dicho proceso es el proveniente de la exposición a T producida durante el periodo crítico (acción organizacional) o de la síntesis local en el hipocampo. Está bien establecido que el cerebro, independientemente del sexo, es un órgano esteroidogénico debido a que los esteroides sexuales pueden cuantificarse en este tejido, además de que su síntesis es independiente de las gónadas y las glándulas suprarrenales (Pelletier, 2010); esto es posible gracias a que el mismo está equipado con todas las enzimas necesarias para la síntesis de E2 y T, de modo que una síntesis *de novo* a partir del colesterol es posible (Fester & Rune, 2021). En particular, el hipocampo expresa las moléculas necesarias para la síntesis de estrógenos esenciales para la función de la plasticidad sináptica (Rune & Frotscher, 2005), se ha observado que tanto la T como la DHT se sintetizan en las neuronas del hipocampo, independientemente del sexo. Por otro lado, numerosos estudios proporcionan cada vez más evidencia que respalda la idea de que cada célula del cerebro de los machos puede diferir con respecto al de hembras debido a diferencias tanto en el complemento de los cromosomas sexuales, como así también en respuesta a efectos hormonales (Arnold, 2022); por lo que no se debería descartar el efecto que pueden llegar a tener los cromosomas. Si bien en nuestro trabajo se encontró que las hembras presentaron menor densidad de espinas dendríticas hipocampales respecto a los machos, no es posible con los resultados obtenidos descartar que el E2 esté ejerciendo su efecto espinogénico.

La plasticidad sináptica es un mecanismo que se desarrolla durante el consumo de drogas, particularmente se sabe que las drogas psicoestimulantes de abuso aumentan la densidad de las espinas dendríticas en los centros de recompensa del cerebro (Ferrerias et al., 2017). Estudios aportados por Ferrerias y colaboradores han demostrado que la Anf aplicada bajo un PDI generó un aumento en la densidad de espinas dendríticas en las neuronas del hipocampo de ratones thy1 machos de PN 33-40 (Ferrerias et al., 2017), especialmente en los ratones que recibieron el tratamiento Sal-Anf. Con respecto a nuestro estudio, no se encontró un aumento en la densidad de espinas dendríticas hipocampales del área CA1 que se

corresponda con la administración del psicoestimulante, por lo que el efecto del tratamiento no estaría actuando como un modulador diferencial entre sexos en el proceso de espinogénesis de animales pre-puberales.

La plasticidad estructural inducida por psicoestimulantes se evidencia a partir de la densidad de las espinas dendríticas, el tamaño y forma de las espinas dendrítica, es decir su morfología, y la arborización o complejidad de dendrítica (Golden & Russo, 2012). En función de lo expuesto, se podría concluir que los machos PN 23 poseen una mayor plasticidad estructural en comparación con de las hembras, ya que, sin importar el tratamiento administrado, se encontró un aumento significativo en la densidad de sus espinas. Por lo general, un aumento en la densidad de espinas se suele relacionar con un aumento en la plasticidad sináptica (Frick et al., 2015).

4.4 Los cambios en la morfogénesis de espinas dendríticas dependen del sexo y/o del tratamiento con anfetamina

Frecuentemente, las anomalías tanto en la morfología como en el número de espinas dendríticas, ocasionadas por condiciones fisiológicas o patológicas, repercuten en su desarrollo, mantenimiento y plasticidad (Chidambaram et al., 2019). La morfología de las espinas dendríticas refleja diferentes grados de desarrollo, siendo las Stubby y Thin las espinas más plásticas, mientras que las Mushroom son menos plásticas y más estables (Sekino et al., 2007). Es importante destacar que la administración repetida de psicoestimulantes modifica la morfología dendrítica en distintas áreas del cerebro (Crombag, 2004; Robinson & Kolb, 2004). Ferreras y colaboradores demostraron en ratones machos PN 33–40 una respuesta morfológica diferencial correlacionada con los diferentes tratamientos en los cuales se administró Anf, siendo que se observó un aumento en la densidad de las espinas del tipo Stubby; resultados similares vieron en experimentos *in vitro* a partir de cultivos neuronas de rata, observándose una mayor densidad de espinas tipo Stubby y Mushroom en respuesta al tratamiento con Anf (Ferreras et al., 2017). El presente trabajo permitió aportar nuevas evidencias que amplían el conocimiento de la plasticidad sináptica estructural en respuesta a Anf en espinas dendríticas hipocampales, gracias al análisis de su morfología en relación con el sexo y la etapa del desarrollo (PN 23), lo cual permite descartar el efecto activacional producido por las hormonas esteroideas provenientes de las gónadas. Específicamente se encontró que la administración de 4mg/kg de Anf en un esquema de PDI con contexto novedoso, provoca un incremento significativo de las espinas dendríticas del tipo Stubby en los machos respecto a hembras

independientemente del tratamiento administrado. En el caso de las espinas tipo Thin, se observó un incremento estadísticamente significativo en hembras PN 23 que recibieron Anf (Sal-Anf) respecto a los machos que recibieron el mismo tratamiento.

Por las características que tienen los diferentes tipos de espinas, se puede considerar que cambios en la frecuencia de espinas Stubby pueden impactar desproporcionadamente en la excitabilidad neuronal en comparación a otros tipos de espinas, debido a que este tipo de estructura se encuentra fuertemente acoplada al eje dendrítico; además se hipotetiza que la falta de cuello evita las conexiones inhibitorias (Noguchi et al., 2005; Schmidt & Eilers, 2009). Por otro lado, Cai y colaboradores (2022), observaron en ratas macho de 6 semanas la existencia de una correlación positiva entre la densidad de espinas tipo Thin y la sensibilización conductual bajo un protocolo de administración crónica de Anf en NAc. Este tipo de espinas se caracteriza por ser de las más plásticas, por lo que son más flexibles a sufrir cambios en respuesta a diversos estímulos. Por último, en este estudio tampoco encontraron una variación en la densidad de espinas del tipo Mushroom en respuesta a la administración crónica de Anf (Cai et al., 2022); es lógico pensar que no se encontraron diferencias en este tipo de espinas ya que son las menos plásticas y más estables (Sekino et al., 2007), por lo que no responden fácilmente a los estímulos externos, tales como la administración de sustancias psicoestimulantes.

Cabe destacar que la sensibilización conductual y la densidad de espinas dendríticas, si bien son procesos que se encuentran vinculados al consumo de drogas, no siempre están acoplados. El desarrollo de la plasticidad comportamental (en este caso la sensibilización conductual) se asocia con una plasticidad estructural sólo en neuronas pertenecientes a ciertas áreas específicas del cerebro, tal como el núcleo del NAc y no a las de la corteza del mismo (Li et al., 2004). Estos indicios se reflejan en los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que no se encontró una correlación entre el aumento de la densidad de espinas dendríticas y la expresión de la sensibilización conductual.

4.5 Conclusiones

A lo largo de la historia, las investigaciones en la temática de adicción a drogas han ignorado la variable sexo, siendo que la mayoría de los estudios se han realizado únicamente en machos, y los resultados finales se han generalizado a la población femenina. Sin embargo, se ha demostrado el papel clave que tienen de las diferencias dependientes del sexo en la

vulnerabilidad al abuso de drogas y la progresión a su uso dependiente, por lo que el desarrollo de estrategias para su prevención y tratamiento requieren estudios detallados que contemplen a ambos sexos (Fattore et al., 2008). En consecuencia, se podría esperar que el conocimiento científico, cambie a medida que avance el campo de la investigación sobre las "diferencias de sexo". Comprender que existen diferencias de sexo en la población general es esencial para buscar estrategias efectivas de intervención y prevención con base biológica para hombres y mujeres con trastornos neuropsiquiátricos, como la drogadicción (Fattore & Melis, 2016).

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesina de grado, se puede concluir que:

- Anf bajo una administración aguda provoca un aumento significativo en la actividad locomotora de machos y hembras, siendo este aumento sexualmente dimórfico ya que se observó una mayor locomoción en hembras.
- Bajo un PDI en un contexto novedoso, se observó que solo las hembras expresan sensibilización conductual en respuesta a una doble administración de Anf.
- En cuanto a la plasticidad estructural, se encontró una mayor densidad de espinas dendríticas hipocampales del área CA1 en machos independientemente del tratamiento administrado.
- Se observaron diferencias dependientes del sexo en la cantidad de las espinas dendríticas hipocampales tipo Stubby, en machos respecto a hembras. En cuanto a las espinas tipo Thin, se encontraron diferencias dependientes del sexo y del tratamiento en animales del grupo Sal-Anf, siendo mayor en las hembras. No se encontraron diferencias en la cantidad de espinas tipo Mushroom.
- Cabe destacar que la sensibilización conductual y la densidad de espinas dendríticas, si bien son procesos que se encuentran vinculados al consumo de drogas, no siempre están acoplados. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no presentaron correlación entre el aumento de la densidad de espinas dendríticas y la expresión de la sensibilización conductual.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFÍA

- Ait-Daoud, N., Blevins, D., Khanna, S., Sharma, S., Holstege, C. P., & Amin, P. (2019). Women and Addiction: An Update. *Medical Clinics of North America*, 103(4), 699–711. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.03.002>
- Akama, K. T., Thompson, L. I., Milner, T. A., & McEwen, B. S. (2013). Post-synaptic Density-95 (PSD-95) Binding Capacity of G-protein-coupled Receptor 30 (GPR30), an Estrogen Receptor That Can Be Identified in Hippocampal Dendritic Spines. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6438–6450. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.412478>
- Amateau, S. K., Alt, J. J., Stamps, C. L., & McCarthy, M. M. (2004). Brain estradiol content in newborn rats: Sex differences, regional heterogeneity, and possible de novo synthesis by the female telencephalon. *Endocrinology*, 145(6), 2906–2917. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1363>
- Amateau, S. K., & McCarthy, M. M. (2002). A Novel Mechanism of Dendritic Spine Plasticity Involving Estradiol Induction of Prostaglandin-E 2. *The Journal of Neuroscience*, 22(19), 8586–8596. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08586.2002>
- Anagnostaras, S. G., & Robinson, T. E. (1996). Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: Modulation by associative learning. *Behavioral Neuroscience*, 110(6), 1397–1414. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.6.1397>
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., Keefe, J. (2006). “The hippocampus book”. <https://doi.10.1093/acprof:oso/9780195100273.001.0001>
- Antelman, S. M., Knopf, S., Caggiula, A. R., Kocan, D., Lysle, D. T., & Edwards, D. J. (1988). Stress and Enhanced Dopamine Utilization in the Frontal Cortex: The Myth and the Reality. *Annals New York Academy Of Sciences*, 262–272.
- Arnold, A. P. (2009). The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm Behav*, 55(5), 570–578. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.03.011>
- Arnold, A. P. (2019). Rethinking sex determination of non-gonadal tissues. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 134, pp. 289–315). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.01.003>
- Arnold, A.P. (2017). "Sex Differences in the Age of Genetics" en *Hormones, brain, and behavior*, eds. D.W. Pfaff & M. Joëls, 3^o ed. (Amsterdam, Países Bajos; Boston, Estados Unidos: Elsevier/Academic Press), 33-48. doi: 10.1016/B978-0-12-803592-4.00092-4
- Arnold, A. P. (2022). X chromosome agents of sexual differentiation. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(9), 574–583. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00697-0>
- Arnold, A. P., Reue, K., Eghbali, M., Vilain, E., Chen, X., Ghahramani, N., Itoh, Y., Li, J.,

- Link, J. C., Ngun, T., & Williams-Burris, S. M. (2016). The importance of having two X chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1688), 20150113. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0113>
- Badiani, A., Oates, M. M., Day, H. E. W., Watson, S. J., Akil, H., & Robinson, T. E. (1998). Amphetamine-Induced Behavior, Dopamine Release, and c- fos mRNA Expression: Modulation by Environmental Novelty. *The Journal of Neuroscience*, 18(24), 10579–10593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-24-10579.1998>
- Bao, A.-M., & Swaab, D. F. (2011). Sexual differentiation of the human brain: Relation to gender identity, sexual orientation and neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.02.007>
- Bardo, M. T., Bowling, S. L., & Pierce, R. C. (1990). Changes in locomotion and dopamine neurotransmission following amphetamine, haloperidol, and exposure to novel environmental stimuli. *Psychopharmacology*, 101, 338–343.
- Becker, J. B., Molenda, H., & Hummer, D. L. (2001). Gender Differences in the Behavioral Responses to Cocaine and Amphetamine: Implications for Mechanisms Mediating Gender Differences in Drug Abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 937(1), 172–187. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03564.x>
- Belluzzi, JamesD., Lee, AlexG., Oliff, HeatherS., & Leslie, FrancesM. (2004). Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology*, 174(3). <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1758-6>
- Berke, J. D., & Hyman, S. E. (2000). Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*, 25(3), 515–532. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81056-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81056-9)
- Bobzean, S., DeNobrega, A., & Perrotti, L. (2014). Sex differences in the neurobiology of drug addiction. *Exp Neurol*, 259, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.022>
- Brandt, N., Löffler, T., Fester, L., & Rune, G. M. (2020). Sex-specific features of spine densities in the hippocampus. *Scientific Reports*, 10(1), 11405. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68371-x>
- Breedlove, S., & Hampson, E. (2002). Sexual differentiation of the brain and behavior. In *Behavioral endocrinology* (Becker JB, Breedlove SM, Crews D, McCarthy MM, pp. 75–116).
- Burwell, R. D., & Agster, K. L. (2008). 3.03 Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System.
- Cabrera Zapata, L. E., Garcia-Segura, L. M., Cambiasso, M. J., & Arevalo, M. A. (2022). Genetics and Epigenetics of the X and Y Chromosomes in the Sexual Differentiation

- of the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12288. <https://doi.org/10.3390/ijms232012288>
- Cai, W. T., Kim, W. Y., Kwak, M. J., Rim, H., Lee, S. E., Riecken, L. B., Morrison, H., & Kim, J.-H. (2022). Disruption of amphetamine sensitization by alteration of dendritic thin spines in the nucleus accumbens core. *Journal of Neurochemistry*, 161(3), 266–280. <https://doi.org/10.1111/jnc.15582>
- Cambiasso, M. J., Cisternas, C. D., Ruiz-Palmero, I., Scerbo, M. J., Arevalo, M. A., Azcoitia, I., & Garcia-Segura, L. M. (2017). Interaction of sex chromosome complement, gonadal hormones and neuronal steroid synthesis on the sexual differentiation of mammalian neurons. *Journal of Neurogenetics*, 31(4), 300–306.
- Carroll, M. E., Lynch, W. J., Roth, M. E., Morgan, A. D., & Cosgrove, K. P. (2004). Sex and estrogen influence drug abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(5), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.03.011>
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J., Essa, M. M., Guillemin, G. J., Chandra, R., & Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92, 161–193. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>
- Collins, S. L., & Izenwasser, S. (2004). Chronic nicotine differentially alters cocaine-induced locomotor activity in adolescent vs. Adult male and female rats. *Neuropharmacology*, 46(3), 349–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2003.09.024>
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*, 14(3), 687–697. <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0525-z>
- Cox, K. H., & Rissman, E. F. (2011). Sex differences in juvenile mouse social behavior are influenced by sex chromosomes and social context. *Genes, Brain and Behavior*, 10(4), 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2011.00688.x>
- Crombag, H. S. (2004). Opposite Effects of Amphetamine Self-administration Experience on Dendritic Spines in the Medial and Orbital Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex*, 15(3), 341–348. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh136>
- Crombag, H. S., Badiani, A., & Robinson, T. E. (1996). Signalled versus unsignalled intravenous amphetamine: Large differences in the acute psychomotor response and sensitization. *Brain Research*, 722(1–2), 227–231. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00066-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00066-2)
- Eisch, A. J., & Harburg, G. C. (2006). Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal

- neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus*, 16(3), 271–286. <https://doi.org/10.1002/hipo.20161>
- Fattore, L., Altea, S., & Fratta, W. (2008). Sex Differences in Drug Addiction: A Review of Animal and Human Studies. *Women's Health*, 4(1), 51–65. <https://doi.org/10.2217/17455057.4.1.51>
- Fattore, L., & Melis, M. (2016). Sex differences in impulsive and compulsive behaviors: A focus on drug addiction. *Addiction Biology*, 21(5), 1043–1051. <https://doi.org/10.1111/adb.12381>
- Fernández Espejo, E. (2006). Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Revista de Neurología*, 43(03), 147. <https://doi.org/10.33588/rn.4303.2005644>
- Ferreras, S., Fernández, G., Danelon, V., Pisano, M. V., Masseroni, L., Chapleau, C. A., Krapacher, F. A., Mlewski, E. C., Mascó, D. H., Arias, C., Pozzo-Miller, L., & Paglini, M. G. (2017). Cdk5 Is Essential for Amphetamine to Increase Dendritic Spine Density in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 372. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00372>
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Zhou, L., Blittersdorf, B. V., Böhm, J., Jarry, H., Schumacher, M., & Rune, G. M. (2012). Estrogen-regulated synaptogenesis in the hippocampus: Sexual dimorphism in vivo but not in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 131(1–2), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.11.010>
- Fester, L., & Rune, G. M. (2015). Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research*, 1621, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.033>
- Fester, L., & Rune, G. M. (2021). Sex neurosteroids: Hormones made by the brain for the brain. *Neuroscience Letters*, 753, 135849. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135849>
- Fink, G., Sumner, B., Rosie, R., Grace, O., & Quinn, J. (1996). Estrogen control of central neurotransmission: Effect on mood, mental state, and memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 16(3), 325–344. <https://doi.org/10.1007/BF02088099>
- Frick, K. M., Kim, J., Tuscher, J. J., & Fortress, A. M. (2015). Sex steroid hormones matter for learning and memory: Estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning & Memory*, 22(9), 472–493. <https://doi.org/10.1101/lm.037267.114>
- Gatica, R. I., Aguilar-Rivera, M. Í., Azocar, V. H., & Fuentealba, J. A. (2020). Individual Differences in Amphetamine Locomotor Sensitization are Accompanied with Changes in Dopamine Release and Firing Pattern in the Dorsolateral Striatum of Rats.

- Neuroscience, 427, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.11.048>
- Godino, A., Jayanthi, S., & Cadet, J. L. (2015). Epigenetic landscape of amphetamine and methamphetamine addiction in rodents. *Epigenetics*, 10(7), 574–580. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1055441>
- Golden, S. A., & Russo, S. J. (2012). Mechanisms of Psychostimulant-Induced Structural Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a011957–a011957. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011957>
- Goodfellow, P. N., & Lovell-Badge, R. (1993). SRY and Sex Determination in Mammals. 27, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.000443>
- Greenfield, S., Back, S., Lawson, K., & Brady, K. (2010). Substance abuse in women. *Psychiatr Clin North Am*, 33(2), 339–355. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2010.01.004>
- Harris, K. M., Jensen, F. E., & Tsao, B. (1992). Three-Dimensional Structure of Dendritic Spines and Synapses in Rat Hippocampus (CA1) at Postnatal Day 15 and Adult Ages: Implications for the Maturation of Synaptic Physiology and Long-term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 12(7), 2685–2705.
- Hersey, M., Bartole, M. K., Jones, C. S., Newman, A. H., & Tanda, G. (2023). Are There Prevalent Sex Differences in Psychostimulant Use Disorder? A Focus on the Potential Therapeutic Efficacy of Atypical Dopamine Uptake Inhibitors. *Molecules*, 28(13), 5270. <https://doi.org/10.3390/molecules28135270>
- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 647–658. <https://doi.org/10.1038/nrn2699>
- Joyce, K. M., Good, K. P., Tibbo, P., Brown, J., & Stewart, S. H. (2021). Addictive behaviors across the menstrual cycle: A systematic review. *Archives of Women’s Mental Health*, 24(4), 529–542. <https://doi.org/10.1007/s00737-020-01094-0>
- Kight, K. E., & McCarthy, M. M. (2020). Androgens and the developing hippocampus. *Biology of Sex Differences*, 11(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00307-6>
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 31–59. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3>
- Koh, I. Y. Y., Lindquist, W. B., Zito, K., Nimchinsky, E. A., & Svoboda, K. (2002). An Image Analysis Algorithm for Dendritic Spines. *Neural Computation*, 14(6), 1283–1310. <https://doi.org/10.1162/089976602753712945>

- Konkle, A. T. M., & McCarthy, M. M. (2011). Developmental Time Course of Estradiol, Testosterone, and Dihydrotestosterone Levels in Discrete Regions of Male and Female Rat Brain. *Endocrinology*, 152(1), 223–235. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0607>
- Kreek, M. J. (2001). Drug Addictions: Molecular and Cellular Endpoints. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 937(1), 27–49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03557.x>
- Kumar, D., & Boehm, U. (2013). Genetic dissection of puberty in mice. *Experimental Physiology*, 98(11), 1528–1534. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071928>
- Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: Contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & Memory*, 23(10), 515–533. <https://doi.org/10.1101/lm.042192.116>
- Laviola, G., Wood, R. D., Kuhn, R., & Spear, L. P. (1995). Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 275(1), 345–357.
- Li, J., Guo, Y., Schroeder, F. A., Youngs, R. M., Schmidt, T. W., Ferris, C., Konradi, C., & Akbarian, S. (2004). Dopamine D₂-like antagonists induce chromatin remodeling in striatal neurons through cyclic AMP-protein kinase A and NMDA receptor signaling. *Journal of Neurochemistry*, 90(5), 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02569.x>
- Liu, J., & Li, J. (2018). Drug addiction: A curable mental disorder? *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(12), 1823–1829. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0180-x>
- Lynch, W. J. (2007). Acquisition and maintenance of cocaine self-administration in adolescent rats: Effects of sex and gonadal hormones. 197, 237–246. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-1028-0>
- Lynch, W., Roth, M., & Carroll, M. (2002). Biological basis of sex differences in drug abuse: Preclinical and clinical studies. *Psychopharmacology*, 164(2), 121–137. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1183-2>
- Magee, J. C., & Grienberger, C. (2020). Synaptic Plasticity Forms and Functions. *Annual Review of Neuroscience*, 43(1), 95–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090919-022842>
- Mäkelä, J.-A., Koskenniemi, J. J., Virtanen, H. E., & Toppari, J. (2019). Testis Development. *Endocrine Reviews*, 40(4), 857–905. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00140>
- Matsumoto, A., & Arai, Y. (1986). Male-Female Difference in Synaptic Organization of the

- Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus in the Rat. *Neuroendocrinology*, 42, 232–236.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
- McCarthy, M. M., Nugent, B. M., & Lenz, K. M. (2017). Neuroimmunology and neuroepigenetics in the establishment of sex differences in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(8), 471–484. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.61>
- McEwen, B. (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.*, 57, 357–384. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.357>
- Mlewski, E. C. (2011). Participación del complejo Cdk5/p35 en el proceso de Sensibilización a drogas psicoestimulantes. Universidad Nacional de Córdoba.
- Mlewski, E. C., Arias, C., & Paglini, G. (2016). Association between the expression of amphetamine-induced behavioral sensitization and Cdk5/p35 activity in dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, 130(1), 114–122. <https://doi.org/10.1037/bne0000118>
- Montoya, D. A. C., & Carrer, H. F. (1997). Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats.
- Mukai, H., Tsurugizawa, T., Ogiue-Ikeda, M., Murakami, G., Hojo, Y., Ishii, H., Kimoto, T., & Kawato, S. (2006). Local Neurosteroid Production in the Hippocampus: Influence on Synaptic Plasticity of Memory. *Neuroendocrinology*, 84(4), 255–263. <https://doi.org/10.1159/000097747>
- Nelson, R. J. (2011). *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. 4th Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Nestler, E. J. (2001). Psychogenomics: Opportunities for Understanding Addiction. *The Journal of Neuroscience*, 21(21), 8324–8327. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08324.2001>
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. P. (2008). Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 65–75. <https://doi.org/10.1038/nrn2303>
- Newpher, T. M., & Ehlers, M. D. (2009). Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends in Cell Biology*, 19(5), 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.02.004>

- Nicholson-Dykstra, S., Higgs, H. N., & Harris, E. S. (2005). Actin Dynamics: Growth from Dendritic Branches. *Current Biology*, 15(9), R346–R357. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.04.029>
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2005). Spine-Neck Geometry Determines NMDA Receptor-Dependent Ca²⁺ Signaling in Dendrites. *Neuron*, 46(4), 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.015>
- Nugent, B. M., Schwarz, J. M., & McCarthy, M. M. (2011). Hormonally mediated epigenetic changes to steroid receptors in the developing brain: Implications for sexual differentiation. *Hormones and Behavior*, 59(3), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.009>
- Pelletier, G. (2010). Steroidogenic Enzymes in the Brain: Morphological Aspects. In *Progress in Brain Research* (Vol. 181, pp. 193–207). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81011-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81011-4)
- Pfaff, D. W., & Christen, Y. (Eds.). (2013). *Multiple Origins of Sex Differences in Brain: Neuroendocrine Functions and their Pathologies*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-33721-5>
- Purves-Tyson, T. D., Boerrigter, D., Allen, K., Zavitsanou, K., Karl, T., Djunaidi, V., Double, K. L., Desai, R., Handelsman, D. J., & Weickert, C. S. (2015). Testosterone attenuates and the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, potentiates amphetamine-induced locomotion in male rats. *Hormones and Behavior*, 70, 73–84.
- Quigley, J. A., Logsdon, M. K., Turner, C. A., Gonzalez, I. L., Leonardo, N. B., & Becker, J. B. (2021). Sex differences in vulnerability to addiction. *Neuropharmacology*, 187, 108491. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108491>
- Robinson, T. E., & Becker, J. B. (1986). Enduring Changes in Brain and Behavior Produced by Chronic Amphetamine Administration: A Review and Evaluation of Animal Models of Amphetamine Psychosis. *Brain Research Reviews*, 11, 157–198.
- Robinson T (1988). Stimulant drugs and stress: factors influencing individual differences in the susceptibility to sensitization, in: Kalivas, P. W. & Barnes, C. *Sensitization of the Nervous System*, 145–173.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: An incentive-sensitization theory of addiction. *Neuropharmacology*, 18, 247–291.
- Robinson, T. E., & Kolb, B. (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology*, 47, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.06.025>

- Robledo, P. (2008). Las anfetaminas. *Trastornos Adictivos*, 10(3), 166–174. [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(08\)76363-3](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(08)76363-3)
- Roth, M., Cosgrove, K., & Carroll, M. (2004). Sex differences in the vulnerability to drug abuse: A review of preclinical studies. *Neurosci Biobehav*, 28(6), 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.08.00>
- Rune, G. M., & Frotscher, M. (2005). Neurosteroid synthesis in the hippocampus: Role in synaptic plasticity. *Neuroscience*, 136(3), 833–842. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.056>
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609–625. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Santos-Toscano, R., Arevalo, M. A., Garcia-Segura, L. M., Grassi, D., & Lagunas, N. (2023). Interaction of gonadal hormones, dopaminergic system, and epigenetic regulation in the generation of sex differences in substance use disorders: A systematic review. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 71, 101085. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2023.101085>
- Schmidt, H., & Eilers, J. (2009). Spine neck geometry determines spino-dendritic cross-talk in the presence of mobile endogenous calcium binding proteins. *Journal of Computational Neuroscience*, 27(2), 229–243. <https://doi.org/10.1007/s10827-009-0139-5>
- Schramm-Sapyta, N. L., Pratt, A. R., & Winder, D. G. (2004). Effects of periadolescent versus adult cocaine exposure on cocaine conditioned place preference and motor sensitization in mice. *Psychopharmacology*, 173(1–2), 41–48. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1696-3>
- Segura, R. K. V., & Barenque, L. C. (2018). Las espinas dendríticas, su función y algunas alteraciones.
- Sekino, Y., Kojima, N., & Shirao, T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*, 51(2–4), 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.04.029>
- Sorra, K. E., & Harris, K. M. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), 501–511. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:5<501::AID-HIPO1>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:5<501::AID-HIPO1>3.0.CO;2-T)
- Sulzer, D. (2011). How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission. *Neuron*, 69(4), 628–649. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>
- Terasawa, E., & Ojeda, S. (2009). Neuroendocrine regulation of puberty. In *Molecular*

- mechanisms of hormone actions on behavior (Etgen AM, Pfaff DW, pp. 603–380).
- Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Aubier, B., Greengard, P., Hervé, D., & Girault, J.-A. (2010). Mechanisms of Locomotor Sensitization to Drugs of Abuse in a Two-Injection Protocol. *Neuropsychopharmacology*, 35(2), 401–415. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.143>
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Kalivas, P. W. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: A critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151(2–3), 99–120. <https://doi.org/10.1007/s002130000493>
- Vezina, P., & Leyton, M. (2009). Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology*, 56, 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.070>
- Vigil, P., Del Río, J. P., Carrera, B., Aránguiz, F. C., Rioseco, H., & Cortés, M. E. (2016). Influence of Sex Steroid Hormones on the Adolescent Brain and Behavior: An Update. *The Linacre Quarterly*, 83(3), 308–329. <https://doi.org/10.1080/00243639.2016.1211863>
- Volkow, N. D., Michaelides, M., & Baler, R. (2019). The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Physiological Reviews*, 99(4), 2115–2140. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2018>
- Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally Occurring Fluctuation in Dendritic Spine Density on Adult Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 10(12), 4035–4039. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-04035.1990>
- Yagi, S., & Galea, L. A. M. (2019). Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 44(1), 200–213. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0208-4>