



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

## Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de  $17\beta$  estradiol y la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas disociadas del estriado dorsolateral y del núcleo accumbens *core* y *shell* de la rata ovariectomizada

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

L.B.M. Erika Lorena Arroyo Ríos

Directores:

Dr. Kurt Leroy Hoffman

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

## Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del  $17\beta$  estradiol y la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas dissociadas del estriado dorsolateral y del núcleo accumbens *core* y *shell* de la rata ovariectomizada

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**L.B.M. Erika Lorena Arroyo Ríos**

**Directores:**

Dr. Kurt Leroy Hoffman

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

**Comité Tutorial**

Dr. Oscar González Flores

Dr. Marcos García Juárez

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla

Dr. José Gustavo López y López

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021

## HOJA DE FINANCIAMIENTO

ESTE PROYECTO REALIZADO EN LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (PERTENECIENTE AL PROGRAMA PARA EL FORTALECIMIENTO DEL POSGRADO NACIONAL, PNP) FUE REALIZADO CON APOYO DE LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA, CON NÚMERO DE CLAVE 100317188-UALVIEP-18/2 Y FONDOS DEL LABORATORIO DE NEUROMODULACIÓN DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA-BUAP, Y EN ESTRECHA COLABORACIÓN CON EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL, CINVESTAV-UATx

**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Erika Lorena Arroyo Ríos** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Efecto del 17  $\beta$ -estradiol y la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas agudamente disociadas del estriado dorsolateral y del núcleo accumbens “core” y “shell” de la rata ovariectomizada”**.


Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., ENERO 25 DE 2021



---

DR. OSCAR GONZÁLEZ FLORES



---

DR. KURT LEROY HOFFMAN



---

DR. GUSTAVO LÓPEZ Y LÓPEZ



---

DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA



---

DR. MARCOS GARCÍA JUÁREZ

## AGRADECIMIENTOS

- Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por la oportunidad de volver a encontrar habilidades en mí que había perdido.



- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



### **Agradecimiento especial:**

A la comisión revisora:

**Dr. Oscar González Flores**

**Dr. Marcos Juárez García**

**Dra. Dora Luz Corona Quintanilla**

**Dr. José Gustavo López y López**

Por el tiempo dedicado a la revisión de este documento, por sus valiosas observaciones, sugerencias y conocimiento transmitido ¡GRACIAS!

## Dedicatoria

A la memoria de mi madre, Guadalupe Ríos Lozada, te extraño siempre.

Al Dr. Oswaldo Torres-Ramírez, amado esposo y compañero en todo momento, gracias por brindarme tu apoyo y paciencia, sobre todo en esos días de experimentos en que pasábamos más de 14 horas registrando. Gracias por tus sabios consejos, eres mi mejor guía. Gracias por compartir este sueño conmigo y por formar parte fundamental de él, pues no tengo palabras para agradecer tu invaluable apoyo, sin ti me hubiera costado el doble alcanzar mi meta. Eres pilar de mi formación, tanto académica como personal, me encanta recorrer esta aventura, llamada vida junto a ti, Te amo.

A mi padre Arnoldo Arroyo, y mis hermanos Arnold, Edgar y Katy, me siento muy orgullosa de tenerlos conmigo, de que sean las maravillosas personas que son, gracias por todo lo vivido, lo enseñado y lo aprendido. Los amo.

A mis amigos del posgrado, Fatima y Omar, gracias por hacer de mis días durante el posgrado, algo más ameno, gracias por tantas charlas y risas, gracias por el aprendizaje, sobre todo en biología. Gracias a mis amigas Blanca y Victoria, por escucharme y apoyarme siempre en este sueño. Las quiero.

# ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	9
1.1 Ciclo estral .....	11
1.2 Núcleo Estriado .....	16
1.2.1 Estriado Dorsal y ventral .....	16
1.2.2 Neurona espinosa mediana: La neurona de proyección del estriado .....	17
1.3 Tipos de receptores a glutamato .....	20
2. Antecedentes.....	23
2.1 Expresión de receptores a estradiol y progesterona en el estriado .....	23
2.2 Efectos del E <sub>2</sub> y la P <sub>4</sub> sobre la conducta y las MSN .....	25
2.2.1 Conducta .....	25
2.2.2 Experimentos <i>in vivo</i> sobre los efectos del E <sub>2</sub> y P <sub>4</sub> sobre las MSNs .....	26
2.2.3 Experimentos en rebanada/ <i>in vitro</i> del E <sub>2</sub> y la P <sub>4</sub> sobre las MSNs .....	27
2.2.4 Experimentos en neuronas aisladas del E <sub>2</sub> y la P <sub>4</sub> sobre las MSNs .....	28
3. HIPÓTESIS.....	31
4. OBJETIVOS .....	32
5. METODOLOGÍA .....	33
5.1 Procedimiento quirúrgico: Ovariectomía .....	33
5.2 Diseño experimental .....	34
5.3 Registro electrofisiológico .....	36
5.4 Análisis estadístico .....	39
6. RESULTADOS .....	41
SECCIÓN 1 ESTRADIOL .....	44
S1.1 Efecto del E <sub>2</sub> sobre la corriente activada por NMDA en MSNs de ratas pretratadas con Benzoato de estradiol .....	43
S1.1.1 Dorsolateral .....	43
S1.1.2 Núcleo Accumbens <i>Core</i> .....	46
S1.1.3 Núcleo Accumbens <i>Shell</i> .....	48
S1.2 Efecto del E <sub>2</sub> sobre la corriente activada por NMDA en MSNs de ratas sin un pretratamiento con Benzoato de estradiol .....	50
S1.2.1 Dorsolateral .....	50
S1.2.2 Núcleo Accumbens <i>Core</i> .....	51
S1.2.3 Núcleo Accumbens <i>Shell</i> .....	52
S1.3 Efecto del pretratamiento con benzoato de estradiol y la subregión estriatal sobre la corriente de NMDA .....	53
S1.3.1 E <sub>2</sub> + pretratamiento con Benzoato de estradiol .....	53
S1.3.2 E <sub>2</sub> sin pretratamiento con Benzoato de estradiol .....	55
SECCIÓN 2 PROGESTERONA.....	59
S2.1 Efecto de la P <sub>4</sub> sobre la corriente activada por NMDA en MSNs de ratas pretratadas con Benzoato de estradiol .....	59
S2.1.1 Dorsolateral .....	59
S2.1.2 Núcleo Accumbens <i>Core</i> .....	62
S2.1.3 Núcleo Accumbens <i>Shell</i> .....	65

S2.2 Efecto la P <sub>4</sub> sobre la corriente activada por NMDA en MSNs de ratas sin un pretratamiento con Benzoato de estradiol .....	67
S2.2.1 Dorsolateral .....	67
S2.2.2 Núcleo Accumbens <i>Core</i> .....	68
S2.2.3 Núcleo Accumbens <i>Shell</i> .....	69
S2.3 Efecto del pretratamiento con benzoato de estradiol y la subregión estriatal sobre la corriente de NMDA .....	70
S2.3.1 E <sub>2</sub> + pretratamiento con Benzoato de estradiol .....	70
S2.3.2 E <sub>2</sub> sin pretratamiento con Benzoato de estradiol .....	72
7. DISCUSIÓN.....	77
8. CONCLUSIONES .....	85
9. REFERENCIAS .....	86



## 1. INTRODUCCIÓN

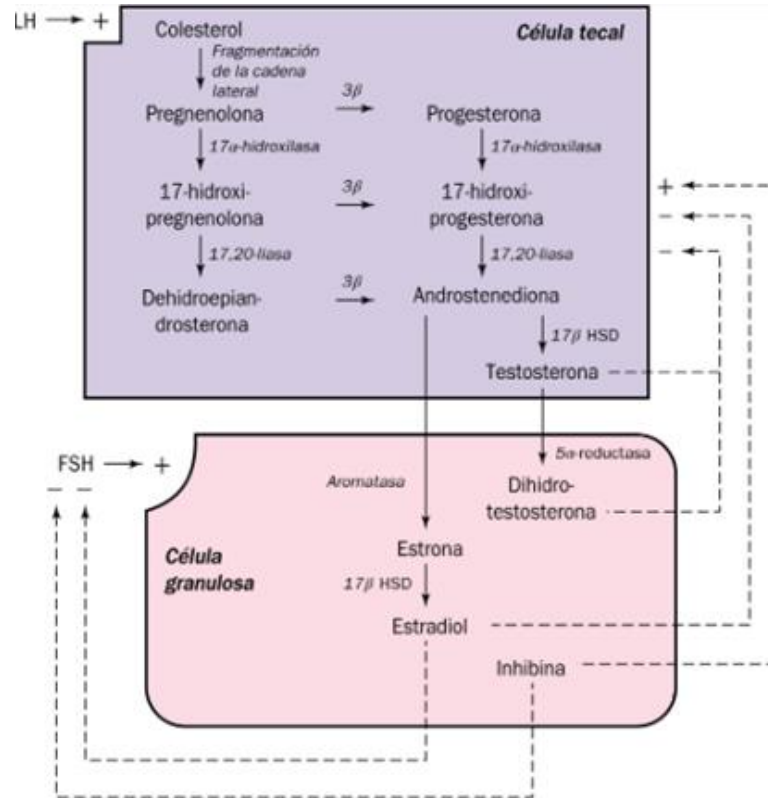
Las hormonas sexuales femeninas como el estradiol ( $E_2$ ) y la progesterona ( $P_4$ ), tienen un papel importante en el desarrollo y funcionamiento normal del organismo de las hembras de múltiples especies de mamíferos. Por lo común, estas hormonas esteroideas son conocidas por el papel que desempeñan en la pubertad, ya que participan en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, como cambios en los órganos reproductores, el inicio de la menstruación y el crecimiento de las glándulas mamarias (Yoest *et al.*, 2018; García-Delgado *et al.*, 2007).

La síntesis y secreción de estas hormonas está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El Hipotálamo secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), misma que es liberada al sistema porta-hipofisiario. Cuando la GnRH interactúa con las células gonadótropas en la hipófisis, favorece la síntesis y liberación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) a la circulación periférica, donde son transportadas hasta llegar al ovario (Gardner & Shoback, 2013; Popat *et al.*, 2008).

En las células de la teca y de la granulosa, constituyentes de los folículos ováricos, la síntesis y liberación de las hormonas esteroideas, son moduladas por la denominada “teoría de dos células o bicelular”. Las células de la teca presentan una densa expresión de receptores a LH, que al activarse favorecen la conversión de colesterol a progesterona y andrógenos (dehidroepiandrosterona sulfato, androstenediona, testosterona). La androstenediona difunde a través de la lámina basal del folículo, hacia las células de la granulosa, donde por la activación del receptor membranal a FSH, se sintetizarán las enzimas necesarias para la producción de los estrógenos (estrón, estradiol, estríol; **Figura 1**).

Esta diferencia en la producción de andrógenos y estrógenos, es debido a que la aromatasasa (enzima limitante de la esteroidogénesis) se expresa abundantemente en las células de la granulosa, mientras que las células intersticiales de la teca expresan las enzimas del citocromo P450,  $17\alpha$ -hidroxilasa/  $17,20$ -liasa (CYP17; Gardner & Shoback, 2013; **Figura 1**). Aunque estas hormonas son sintetizadas principalmente por el ovario, otros órganos esteroidogénicos como la glándula suprarrenal, el hígado, el corazón y el tejido nervioso producen un porcentaje de las mismas (Prieto *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2013). De particular relevancia para este estudio, se ha logrado identificar en modelos murinos, la presencia de la

enzima aromatasa en las neuronas espinosas medianas, y se ha determinado que aumenta la expresión de dicha enzima durante la etapa adulta (Krentzel *et al.*, 2021; Küppers & Beyer, 1998).



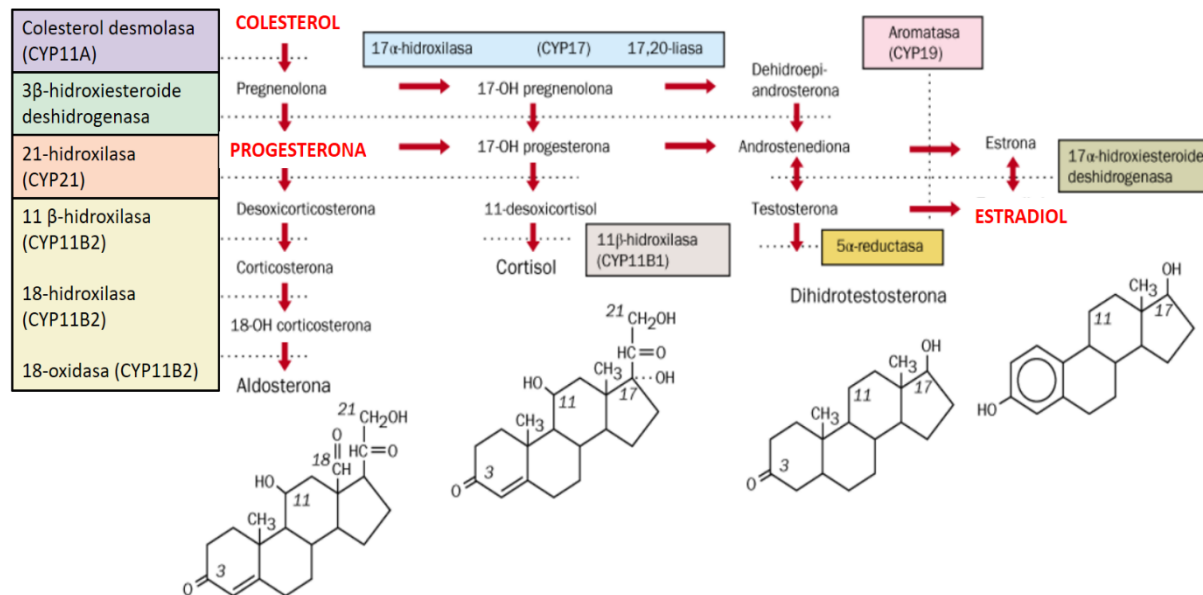
**Figura 1.** Esquema de la teoría de dos células. Se muestran las células foliculares del ovario y se muestra la interacción autócrina y parácrina de algunas moléculas que funcionan sinérgicamente para la producción de andrógenos y estrógenos (Tomado de Gardner & Shoback, 2013).

El primer paso limitante de la esteroidogénesis, es la conversión del colesterol a *pregnenolona*, por acción de la enzima mitocondrial P450<sub>scc</sub> (por sus siglas en inglés: *cholesterol side-chain cleavage enzyme*) en tres reacciones químicas sucesivas; éste es el primer precursor de las hormonas esteroideas (**Figura 2**; Compagnone & Mellon, 2000).

Posteriormente, en el retículo endoplásmico, la pregnenolona puede seguir dos rutas metabólicas: 1) La hidroxilación a *17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona* por acción de la enzima 17 $\alpha$ -Hidroxilasa y 2) la síntesis de P<sub>4</sub> catalizada por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Estos metabolitos son sustrato de las enzimas 17 $\alpha$ -hidroxilasa/C17,20-liasa, cuya actividad los

convierte a deshidroepiandrosterona (DHEA) y a androstenediona respectivamente (**Figura 2**, Do Rego *et al.*, 2009; Compagnone & Mellon, 2000).

La última reacción bioquímica involucra a la enzima aromatasa; misma que produce dos tipos de estrógenos; 17-β estradiol (E<sub>2</sub>; el principal estrógeno circulante en la sangre) y estrona (E<sub>1</sub>), los cuales, al ser metabolizados en el hígado pueden ser convertidos a estriol (E<sub>3</sub>; Domínguez-Ordoñez 2017).



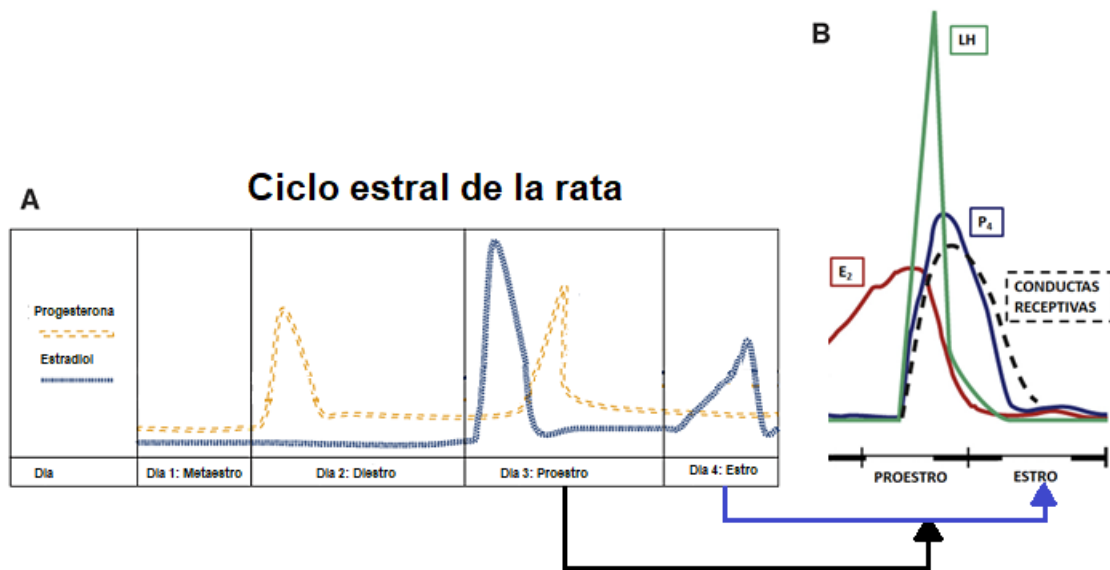
**Figura 2.** Esteroidogénesis. Las hormonas ováricas derivan del colesterol. Al formarse la pregnenolona como primer precursor esta familia de hormonas, se desencadena una serie de reacciones catalizadas principalmente por la familia de enzimas pertenecientes al citocromo P450 (Tomado de Gardner & Shoback, 2013).

Todos estos compuestos derivados del colesterol tienen una fluctuación importante a lo largo del ciclo reproductivo de las hembras, entre ellas, el estro de la rata.

### 1.1 Ciclo estral de la rata

El ciclo estral de la rata puede ser caracterizado por sus despliegues conductuales y se define como el conjunto de patrones hormonales, motores, conductuales y fisiológicos recurrentes, cuya finalidad es la reproducción (Schwartz, 2000; Kauffman & Micevych, 2019); y está caracterizado por cambios morfológicos en las células de los ovarios, del útero y de la vagina (Paccola *et al.*, 2018).

El intervalo entre una ovulación y otra es relativamente corto en las ratas, en promedio dura de 4-5 días y puede dividirse en cuatro fases con características específicas. Las fases son: Proestro, Estro, Metaestro (o Diestro I) y Diestro 2 (**Tabla 1**; Maeda *et al.*, 2000; González-Jatuff *et al.*, 2012; Lewis-Maynard & Downes, 2019); las cuales presentan cambios en la concentración sérica de las hormonas y muestran modificaciones conductuales (**Figura 3, Tabla 1**).



**Figura 3.** Patrón hormonal cíclico y la conducta sexual de la rata. El panel A) muestra los cambios en la concentración sérica de las hormonas estradiol y progesterona a lo largo de las 4 fases propuestas para el ciclo estral. Además, en el panel B) se esquematiza que en la fase de proestro-estro se despliegan las conductas receptivas (Modificado de McGinnis & Pfaff, 2012; Emanuele *et al.*, 2002).

La concentración más elevada de E<sub>2</sub> corresponde al periodo de proestro, mientras que la P<sub>4</sub> aumenta en el diestro y proestro, estas etapas coinciden con la fase lútea y folicular en humanos (Emanuele *et al.*, 2002), la concentración más baja de ambas hormonas es durante la etapa tardía del estro (**Tabla 1**; Freeman, 2006; Guerra-Araiza *et al.*, 2003).

**TABLA 1. Cambios morfológicos, conductuales y hormonales durante el ciclo estral de la rata**

Fase del ciclo estral	Duración (horas) <sup>1,2,3</sup>	Tipo celular abundante en frotis vaginal <sup>1,3,4</sup>	Concentración máxima de Estradiol (pM) <sup>5</sup>	Concentración máxima de Progesterona (nM) <sup>5</sup>	Conductas <sup>6</sup>
<b>Metaestro</b>	6-8	Mayor cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales anucleadas queratinizadas	57.49 ± 3.71	<b>40.85 ± 7.42*</b>	Disminuye receptividad
<b>Diestro</b>	48-72	Combinación de células nucleadas, queratinizadas y neutrófilos y abundantes	29.5 ± 9.66	33.34 ± 15.06	Decremento de conducta exploratoria y hembra no permite la cópula (conductas no receptivas)
<b>Proestro</b>	12-14	Mayor cantidad de células epiteliales nucleadas, leucocitos y pocos	<b>141.78 ± 17.53*</b>	18.78 ± 8.18	Aumenta conducta exploratoria y motora, pero no permite la cópula
<b>Estro</b>	24-48	Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas y pocas células nucleadas y neutrófilos	25.07 ± 4.88	21.71 ± 4.23	Aumenta conducta copulatoria como la lordosis y la receptividad

1) Cora *et al.*, 2015; 2) Paccola *et al.*, 2013; 3) Maeda *et al.*, 2000; 4) Westwood, 2008; 5) Guerra-Araiza *et al.*, 2003; 6) Willett *et al.*, 2019

En la fase de estro se despliega una serie de patrones conductuales definidos como: atractividad, proceptividad y receptividad (Beyer *et al.*, 2007; Beach, 1976). La *atractividad* comprende eventos no conductuales, como la emisión de feromonas y cambios en la apariencia del área genital (hinchazón o coloración genital); La *proceptividad* se manifiesta a través de conductas dirigidas a atraer la atención del macho, como carreras cortas en forma de zig-zag (darting), movimiento rápido de la cabeza y de las orejas, además de brincos que realiza la hembra sobre sus patas y termina con una postura de inmovilidad (González-Flores *et al.*, 2015; Beyer *et al.*, 2007; Rivas & Mir, 1990). Finalmente, el patrón conductual más representativo y estudiado es la *receptividad* (respuesta necesaria para que la hembra acceda la cópula) es el reflejo de la lordosis, que consiste en la dorsiflexión de la columna vertebral, acto que eleva la región perigenital y conlleva un levantamiento de la cola, que permitirá la intromisión del pene dentro de la vagina (Dominguez-Ordoñez., 2017; Beyer *et al.*, 2007; Rivas & Mir, 1990; Beach, 1976).

Desde principios del siglo XX se han detallado las características, los componentes hormonales y las áreas cerebrales que se correlacionan con el circuito de la lordosis. Puesto que existe una ciclicidad hormonal que se relaciona con el comportamiento sexual de la hembra, se propuso a la ovariectomía (OVX) como modelo de estudio para las conductas estereotipadas expresadas en las fases de proestro-estro, pues los resultados en diversas especies al remover

los ovarios, fue la concomitante disminución y/o supresión de estos comportamientos (Kauffman & Micevych, 2019; Pfau *et al.*, 2015).

En 1929, diversos investigadores aislaron e identificaron al E<sub>2</sub> y para comprobar su papel sobre la conducta sexual, se comenzaron una serie de estudios que incluía el tratamiento con E<sub>2</sub> a ratas OVX. Los resultados mostraron que, en muchos casos, para una expresión de conducta sexual, se necesitaba la inyección de cantidades no fisiológicas de E<sub>2</sub>. Posteriormente, tras el descubrimiento de la P<sub>4</sub> se estableció que, un tratamiento combinado con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> inducían una máxima respuesta receptiva sexual en la hembra, hecho que sugiere una acción sinérgica (Kauffman & Micevych, 2019).

Derivado de estos experimentos, se ha demostrado que para la inducción de lordosis: 1) si solo se administra E<sub>2</sub>, requiere de dosis superiores a las fisiológicas, 2) la administración repetida de dosis bajas de E<sub>2</sub> pueden alcanzar eventualmente la receptividad sexual mientras que, un tratamiento con ambas hormonas facilita niveles constantes de alta receptividad sexual; además 3) las ratas OVX con un pretratamiento con Benzoato de Estradiol (BE<sub>2</sub>) proseguido de E<sub>2</sub> facilita la lordosis en ausencia de P<sub>4</sub> y 4) es necesaria una exposición al E<sub>2</sub> hasta de 24 horas para que se induzca la síntesis del receptor a P<sub>4</sub> y se logre una máxima expresión de la conducta de lordosis (CL; Clark, 2013; González-Flores *et al.*, 2015; Micevych *et al.*, 2017). Aparte de estas hormonas, se han descrito otras moléculas lordogénicas como la GnRH, la prostaglandina E<sub>2</sub>, la leptina, entre otros, que pueden regular positivamente la CL (Beyer *et al.*, 2003; Domínguez-Ordóñez, 2017). Sin embargo, los circuitos subyacentes a la *proceptividad*, han sido menos caracterizados.

Recientemente otras áreas cerebrales han cobrado relevancia por ser sustratos neuronales de las hormonas ováricas; por ejemplo, el E<sub>2</sub> sensibiliza a las neuronas del hipotálamo, estimulando la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual tiene la capacidad de inducir la CL, así como la liberación de gonadotropinas que, a su vez, provocan la ovulación (Domínguez-Ordóñez, 2017).

También en las neuronas piramidales del hipocampo, se ha encontrado que un tratamiento con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, incrementan la densidad de espinas dendríticas, además de inducir la formación de sinapsis solo en la capa CA1; hecho que mejora la memoria, la cognición y el aprendizaje del individuo. Sin embargo, tratamientos de E<sub>2</sub> combinado con P<sub>4</sub> en ratas OVX,

después de 6 horas reducen la arborización dendrítica posiblemente debida a una acción bifásica de esta hormona (Cyr *et al.*, 2001; Woolley & S. McEwen, 1993). También se ha demostrado que estas neuronas hipocampales sintetizan localmente E<sub>2</sub>, este hecho sugiere que se activa un mecanismo de modulación rápida, necesaria para los procesos de consolidación de la memoria y el aprendizaje, al aumentar temporalmente las espinas dendríticas (Pozzo-Miller *et al.*, 1999; Kretz *et al.*, 2004). Este fenómeno biológico es dependiente del aumento transitorio de Ca<sup>2+</sup> tras la activación del receptor glutamatérgico tipo NMDA en ratas neonatas de 7 días (Pozzo-Miller *et al.*, 1999). Asimismo, en el hipocampo, la corteza del cíngulo, la sustancia *nigra*, la corteza cerebral, y en el estriado dorsal, las hormonas ováricas se han asociadas con procesos de neuroprotección en modelos experimentales (Rusa *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 2008).

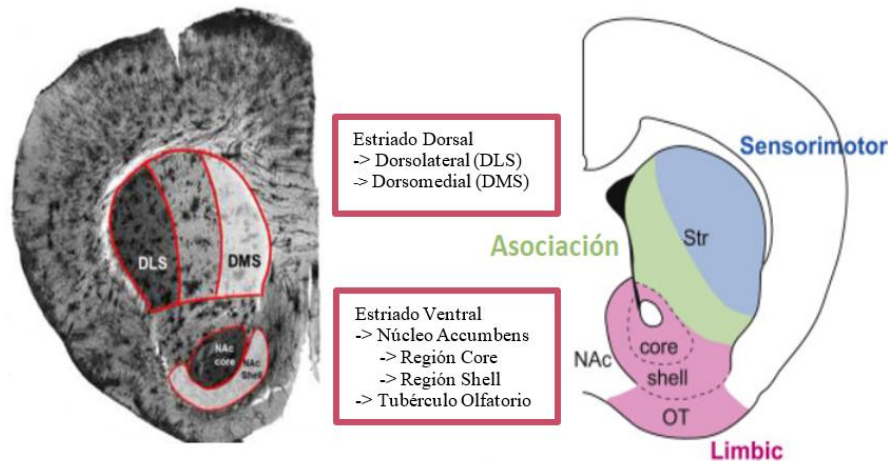
Por otra parte, se ha demostrado que algunos metabolitos de la P<sub>4</sub>, como la allopregnanolona y la dihidroxiprogesterona son afines a los sitios de unión a benzodiazepinas y barbitúricos en el receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>, produciendo una modulación positiva sobre el canal al aumentar la corriente de Cl<sup>-</sup> en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (Compagnone & Mellon, 2000). Así mismo, la tetrahydroprogesterona y el 20-hidroxicicoseno incrementan la corriente evocada por el ácido  $\gamma$ -aminobutírico GABA (Sasa M. *et al.*, 1996); mientras que el sulfato de pregnenolona y el sulfato de dehidroepandrosterona reducen la corriente GABAérgica.

A pesar de estos estudios, los mecanismos subyacentes a la interacción fisiológica del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre la excitabilidad neuronal en otras áreas involucradas en los circuitos de atraktividad y *proceptividad* es incierta. Tal es el caso del núcleo estriado dorsal y ventral, regiones involucradas esencialmente en la regulación de las conductas de locomoción y motivación, principales características de las conductas de la proceptividad (Cyr *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2018). Por consiguiente, consideramos de importancia estudiar el efecto del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre las neuronas del estriado.

## 1.2 Núcleo Estriado

**1.2.1. Estriado dorsal y ventral.** El Núcleo Estriado (NE) constituye la vía de entrada al circuito de los ganglios basales. Anatómicamente puede ser dividido en dos partes, *el estriado dorsal* formado por el caudado y el putamen en la mayoría de órdenes de mamíferos (en roedores no existe tal división anatómica), y *el estriado ventral*, formado por el Núcleo accumbens (NAcc) y el tubérculo olfatorio. En roedores, el estriado dorsal puede ser dividido en una porción lateral (dorsolateral) y otra medial (**Figura 4**; Liljeholm & O’Doherty, 2012).

La región dorsomedial recibe aferencias de la corteza parietal, la corteza frontal y cortezas de asociación, mientras que la región dorsolateral recibe aferencias principalmente de la corteza sensorial-motora y está implicado en el establecimiento y expresión de conductas de hábitos, incluidos los aspectos sensoriomotora de la motivación (Yoest *et al.*, 2014).

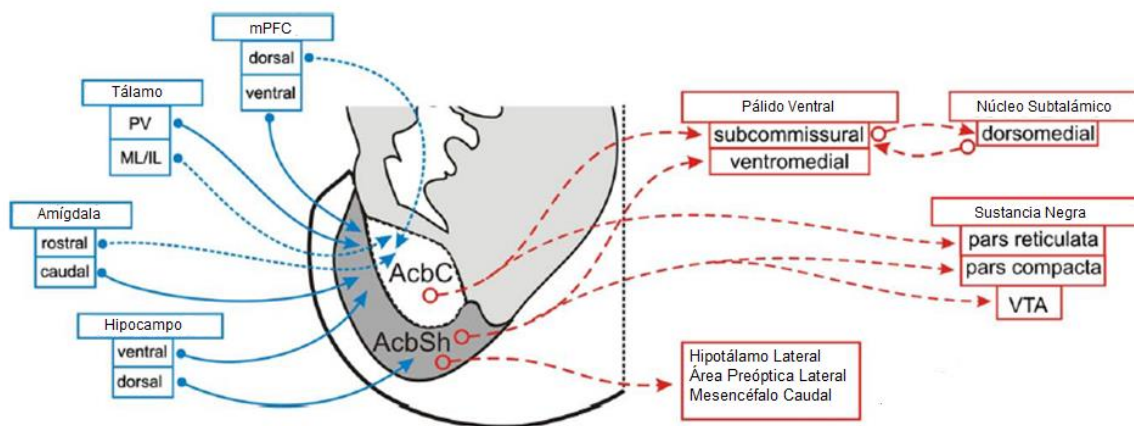


**Figura 4.** División anatómica y funcional del Núcleo Estriado. La imagen muestra de lado izquierdo un corte coronal de un cerebro de rata, donde se demarca en color rojo la región dorsal (superior), y la región ventral (inferior). De lado derecho se muestra un esquema de la funcionalidad propuesta del estriado, debido a sus conexiones con otras áreas cerebrales (Modificado de Taylor *et al.*, 2014; Chuhma *et al.*, 2016)

Por otro lado, el estriado ventral está formado predominantemente por el NAcc, que es subdividido en dos: una región “*core*” (núcleo) y otra región “*shell*” (corteza). La subregión *shell* está implicada en la integración y expresión de las emociones y recibe aferencias provenientes de las cortezas infralímbica, orbitofrontal medial y anterior insular, también del



hipocampo ventral, la amígdala basolateral y el hipocampo; Mientras que la zona *core*, se propone que está implicada en la motricidad y principalmente en el despliegue de conductas motivadas (Micó *et al.*, 2000). La región *core*, recibe proyecciones tanto de la corteza prefrontal dorsomedial y dorsolateral, como de la amígdala basolateral, estas conexiones son de naturaleza glutamatérgica; por otra parte, las aferencias dopaminérgicas provienen predominantemente del área ventral tegmental, mientras que la sustancia negra proyecta al estriado dorsal (**Figura 5**; Yoest *et al.*, 2014, 2018).



**Figura 5.** Esquema de las principales conexiones del Núcleo accumbens. De color azul se muestran las proyecciones que reciben las regiones *core* y *shell*, mientras que en rojo se muestran las principales eferencias (Modificado de Basar *et al.*, 2010)

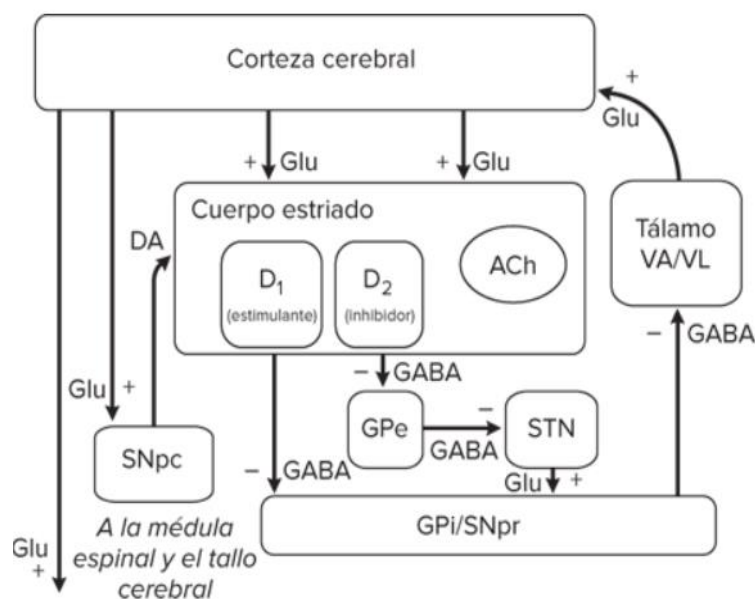
El NAcc está involucrado en múltiples procesos tales como la ingesta, la locomoción, la conducta sexual, las adicciones (como a la nicotina), la respuesta al estrés, los procesos obsesivos-compulsivos, entre otros (Fernández-Espejo, 2000; Ávila-Ruíz *et al.*, 2014; Sturm *et al.*, 2005). Esta área del cerebro se propone como una “interfase” emotiva-motora, pues integra los estímulos para seleccionar y ejecutar comportamientos apropiados según el entorno y el estado fisiológico del organismo, basado en un aprendizaje sobre procesos donde del individuo obtiene una recompensa (Yoest *et al.*, 2018).

### 1.2.2. Neurona Espinosa Mediana: La neurona de proyección del estriado.

La célula de proyección y más abundante en el estriado, es la neurona GABAérgica Espinosa Mediana (MSN por sus siglas en inglés, Medium Spiny Neuron) con una población mayor al 95%. En el estriado dorsal se reciben aferencias de cortezas de asociación como la prefrontal, medial orbitofrontal y cingulada anterior, por otro lado, también reciben información somatomotora, por ejemplo, la corteza motora (Parsons & Hurd, 2015). Las MSNs de la región *Core* proyectan predominantemente al globo pálido ventral y a la sustancia negra, mientras que las eferentes del NAcc-*Shell* van dirigidas hacia el globo pálido ventromedial y al área ventral tegmental (Francis & Lobo, 2017; Nicola, 2007). El 5% restante de la población celular corresponde a interneuronas locales gigantes colinérgicas no espinosas, e interneuronas inmunorreactivas a tirosina-hidroxilasa y a calretinina (Soares-Cunha *et al.*, 2018).

Las MSNs reciben aferentes *glutamatérgicas* (excitatorias) provenientes de la corteza prefrontal, el tálamo, el hipocampo y la amígdala basolateral (Taverna *et al.*, 2004). Diversos estudios han clasificado a las MSNs en dos grupos basándose en sus propiedades bioquímicas y en las proyecciones. El primer grupo neuronal (clasificado como perteneciente a la vía directa o vía nigroestriada), proyecta a la Sustancia Negra reticulada (SNr) y al segmento interno del Globo Pálido (GPi) y tiene una alta expresión de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> y coexpresan dinorfinas y sustancia P (**Figura 5**).

La SNr y el GPi inhiben a los núcleos talámicos, las cuales envían proyecciones glutamatérgicas a la corteza cerebral, incluyendo la corteza límbica, y la corteza asociativa, y la corteza sensoriomotora; la última encargada de promover la ejecución de los movimientos del cuerpo y la conducta. Así, la activación de las MSNs de la vía directa inhibiría a los núcleos (el GPi y la SNr) que mantienen reducida la actividad del tálamo, permitiendo así la activación de la corteza por las proyecciones talamocorticales. La activación de la corteza sensorimotora permitiría la ejecución de movimiento (Purves, 2004; Matamales *et al.*, 2009).



**Figura 6.** Diagrama de las vías de los ganglios basales. El cuerpo estriado es el núcleo de entrada al circuito, y recibe múltiples proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza cerebral. Las vías de salida de éste circuito son a través de dos vías, la directa y la indirecta (Glu= Glutamato, DA= Dopamina, ACh= Acetilcolina, SNpc= Sustancia Negra pars compacta, SNpr= Sustancia Negra pars reticulada, GPe= Globo pálido externo, GPi= Globo Pálido interno, STN= Núcleo subtalámico VA/VL= Ventroanterior/Ventrolateral; (Modificado de Brunton: Goodman & Gilman *et al.*, 2019)

Por otra parte, el segundo grupo de MSNs que participa en la vía indirecta, tiene eferencias al GP externo y expresan una alta densidad poblacional de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub> y expresan encefalinas (Nicola *et al.*, 2000). La vía indirecta tiende a inhibir los movimientos, mediante de la inhibición del globo pálido segmento externo (GPe), el cuál inhibe tónicamente el núcleo subtalámico (STN), lo cual aumenta la actividad del GPi/SNr, inhibiendo las proyecciones talamocorticales (**Figura 6**).

Algunas investigaciones sugieren que las MSNs del NAcc también pueden coexpresar receptores tipo D<sub>3</sub> y ambos grupos neuronales pueden participar en la regulación de las dos vías (Nicola *et al.*, 2000; Kupchik & Kalivas, 2017).

Las diferentes proyecciones que reciben las MSNs regulan su actividad debido a la interacción de diversos neurotransmisores y moduladores con sus receptores “específicos” expresados en la membrana plasmática de los somas neuronales; la literatura ha descrito que las MSNs expresan diferentes receptores dopaminérgicos, glutamatérgicos, GABAérgicos, a E<sub>2</sub>, a P<sub>4</sub>, entre otros (Blas de la Peña, 2012; Meitzen *et al.*, 2018; Sazdanovic *et al.*, 2013; Mermelstein

*et al.*, 1996). Este núcleo está altamente regulado por la dopamina, a pesar de ello, este neuromodulador no comanda por si solo la salida de la información del circuito de los ganglios basales, sino que hace falta la regulación de la sinapsis mediada por proyecciones glutamatérgicas provenientes de diversas áreas cerebrales, mismas que muestran una sensibilidad a las hormonas ováricas (Proano, 2020). Se ha descrito que las aferentes dopaminérgicas en el NAcc expresan receptores a glutamato del tipo NMDA y AMPA (Tarazi & Baldessarini, 1999), al igual que los axones glutamatérgicos provenientes de corteza cerebral y áreas subcorticales (Tarazi *et al.*, 1998, Blas de la Peña, 2012).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central, su liberación hacia la hendidura sináptica se inicia con la propagación del impulso nervioso. Cuando el glutamato es excitado, interactúa con sus respectivos receptores en la membrana postsináptica, con una posterior decaída en su concentración como resultado de su difusión y por la acción de transportadores (EEAT1-5) que recapturan el glutamato, para su degradación en glutamina en las células de la glía y su posterior reutilización para formar de nuevo glutamato (Flores-Soto *et al.*, 2012; Lee-Rivera & López-Colomé, 2005; Meyer & Quenzer, 2010). El estriado recibe una densa inervación glutamatérgica de zonas como la corteza prefrontal, estructura involucrada en el estado de ánimo y las funciones cognitivas; y es (junto con la dopamina) uno de los principales reguladores de la actividad de las MSN's (Calabresi *et al.*, 1997).

### **1.3 Tipos de receptores de glutamato**

El glutamato puede activar diferentes tipos de receptores, que se pueden clasificar en dos familias, los acoplados a proteínas G (GPCR por sus siglas en inglés *G protein-coupled receptors*) y los que son un canal iónico:

- 1) Receptores metabotrópicos (mGluRs): Promueven la activación de segundos mensajeros a través de proteínas G. Son subdivididos en tres clases (Lee-Rivera & López-Colomé, 2005): **Grupo I** (mGluR1 y mGluR5) activan a la proteína

Fosfolipasa C (PLC); **Grupo II** (mGluR2 y mGluR3) inhiben la adenilato ciclasa, **Grupo III** (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) inhiben la adenilato ciclasa.

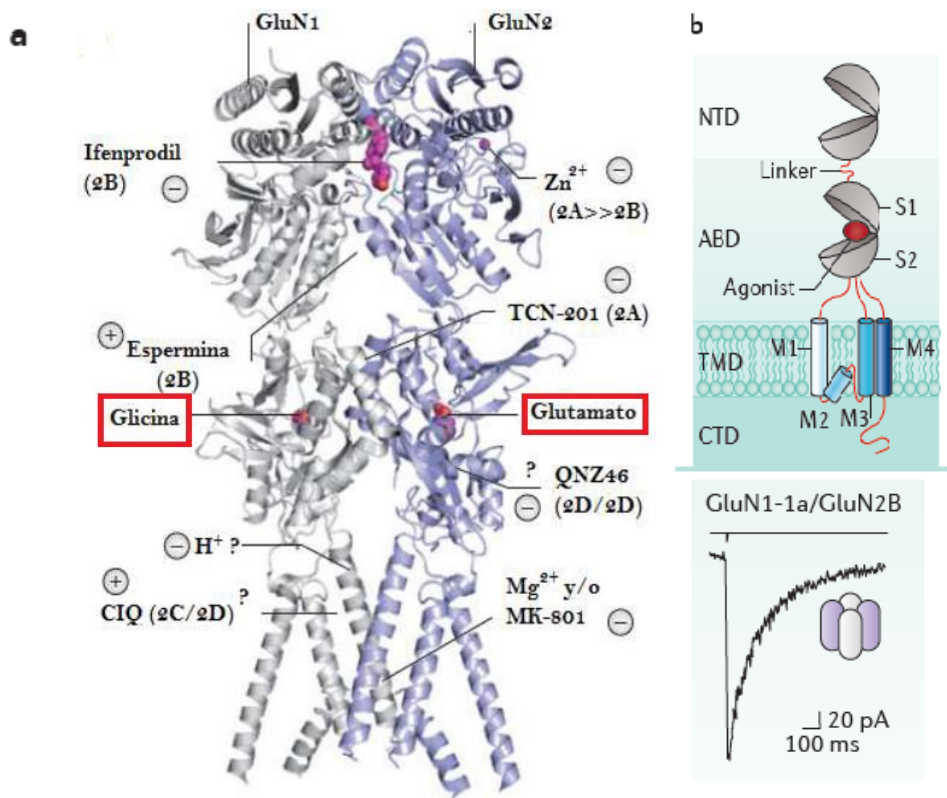
- 2) Receptores ionotrópicos: Están acoplados a un canal iónico. Se clasifican de acuerdo a la afinidad hacia agonistas y se subdividen en tres grupos (Lee-Rivera & López-Colomé, 2005; Dingledine *et al.*, 1999): **Receptor NMDA** con afinidad al agonista N-Metil-D-aspartato (NMDA). **Receptor AMPA**: Afinidad al agonista  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y el **Receptor a Kainato**: Afinidad al agonista ácido Kaínico (kainato).

Este trabajo se centra en el estudio de la actividad del receptor a NMDA (NMDAR), debido a su participación en diferentes procesos neuronales. Su alta permeabilidad para el ion  $\text{Ca}^{2+}$  es lo que le confiere un papel central tanto en situaciones fisiológicas como en condiciones patológicas (Paoletti & Neyton, 2007). Otras características distintivas del NMDAR es el bloqueo voltaje – dependiente dada por la presencia extracelular del  $\text{Mg}^{2+}$  y que, también se requiere de la unión del coagonista glicina (o D-Serina) en la subunidad GluN1, para la activación del receptor.

Además del sitio de unión para glicina y glutamato, los NMDAR poseen múltiples sitios de interacción para otros ligandos, que actúan como moduladores alostéricos selectivos de las subunidades. Entre estas moléculas se encuentran moduladores positivos como la espermina, las poliaminas y el CIQ, y otros moduladores negativos como el Ifenprodil, TCN-201 y el  $\text{Mg}^{2+}$  (Flores-Soto *et al.*, 2012; Paoletti *et al.*, 2013).

La estequiometría del NMDAR no se ha establecido definitivamente, debido a que se ha demostrado que puede formar estructuras tetra o pentaméricas, pero el consenso es que el NMDAR es un tetrámero formado por la conjunción de diferentes subunidades con sitios de acción diferentes entre sí (**Figura 7**).

Estas subunidades se denominan GluN1, GluN2 y GluN3 (Flores-Soto *et al.*, 2012). En el estriado se ha reportado la presencia del RNA mensajero y la expresión predominantemente de las subunidades GluN1 y GluN2A o B (Landwehrmeyer *et al.*, 1995; Dunah & Standaert, 2003; Evans *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Estequiometría del receptor NMDA. A) Modelo de un homodímero de las subunidades GluN1 y GluN2 del receptor de NMDA. La estructura fue basada en la cristalización de la estructura GluN1/GluN2B. Los signos positivos (+) y negativos (-) indican el tipo de regulación alostérica en cada subunidad. El signo “?” indica una localización incierta del sitio de unión en las subunidades, B) Ilustración sobre la estructura que comparten las subunidades del NMDAR, el dominio de unión al agonista (ABD) muestra la posición donde la glicina, el NMDA y otros agonistas se unen para evocar una corriente iónica (mostrada en el panel inferior derecho, Modificado de Paoletti *et al.*, 2013)

## 2. ANTECEDENTES

La conducta sexual femenina inducida por la administración de E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> en ratas OVX, ha sido un modelo experimental importante para elucidar mecanismos fisiológicos, que subyacen a los efectos de hormonas esteroides sobre la conducta. Por un lado, este modelo puede ser utilizado para estudiar la interacción de estas hormonas en los circuitos neuronales para modular, específicamente la conducta sexual femenina (Krentzel & Meitzen, 2018). Por otra parte, este modelo también se ha aprovechado para probar hipótesis sobre como el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> interactúan a nivel celular, a través de la convergencia de diferentes vías de señalización para facilitar ciertas conductas, como la lordosis (CL; Domínguez-Ordoñez *et al.*, 2015).

Esta propuesta de *crossstalk* o comunicación cruzada entre receptores a esteroides, plantea que efectos intra y extracelulares convergen en la síntesis de proteínas, entre ellas el receptor a progesterona (RP) y de E<sub>2</sub>, esenciales para las conductas sexuales (Beyer *et al.*, 2003). El RP para ser activado, necesita de un proceso de fosforilación. La tirosín-cinasa SRC (*stored response chain*) tiene la característica de que, en estado activo, forma un complejo enzimático con los receptores de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, que activa la vía de las MAP cinasas y consecuentemente produce la fosforilación de los sustratos que facilitan la lordosis (González-Flores *et al.*, 2015).

### 2.1. Receptores E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> y su expresión en el estriado.

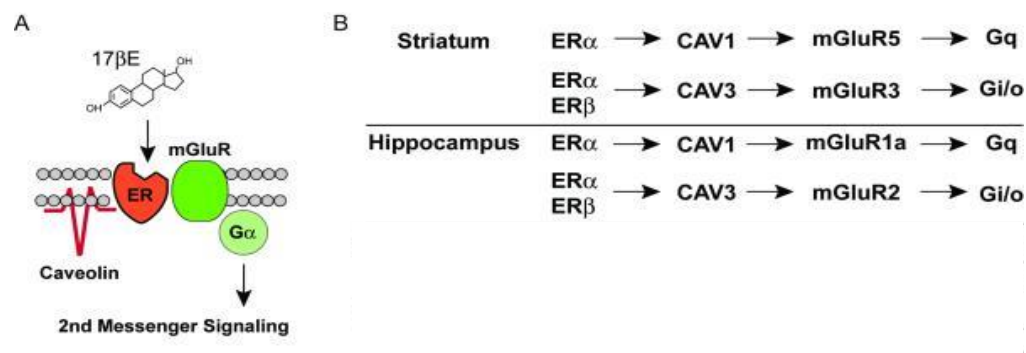
El E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> pueden utilizar una amplia variedad de mecanismos celulares para regular la actividad neuronal. Los efectos hormonales pueden ser considerados a corto y largo plazo, y pueden clasificarse en una “vía clásica” que implica la difusión de la molécula esteroidea al interior de la célula para interactuar con su receptor citoplasmático, convirtiéndose en un regulador transcripcional que tiene afinidad por secuencias palindrómicas específicas en el ADN llamado elemento de respuesta hormonal. Este proceso puede tomar de horas a días para que pueda ser evaluado por diferentes modelos experimentales (Prieto *et al.*, 2003).

Los mecanismos “no clásicos” no involucran la síntesis inmediata de proteínas y se caracterizan por tener efectos rápidos sobre la actividad celular (segundos o minutos). Incluyen la activación de receptores membranales que generan segundos mensajeros que pueden modular

la actividad de canales iónicos. Estas dos vías pueden converger para regular las diferentes funciones celulares mediadas por las hormonas esteroideas (Prieto *et al.*, 2003; Cover *et al.*, 2014; Rekawiecki *et al.*, 2017).

El E<sub>2</sub> tiene 2 receptores intracelulares que, cuando son activados forman dímeros y se translocan al núcleo, son denominados ER $\alpha$  and Er $\beta$  y recientemente se ha caracterizado un receptor metabotrópico sensible a E<sub>2</sub>, nombrado GPER-1 (Zimmerman *et al.*, 2016). Sin embargo, existe poca evidencia que soporte la idea de la expresión de los receptores ER $\alpha$  y Er $\beta$  en el citoplasma de las MSNs (Paff & Kener 1973; Becker 1990; Mermelstein *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 2018 Yoest *et al.*, 2018).

Se ha documentado que ER $\alpha$  and Er $\beta$  están expresados en la membrana celular de las MSNs, acoplados a un receptor metabotrópico de glutamato mediante un microdominio a través de la proteína caveolina 1 y 3, que pueden pertenecer a diferentes familias de proteínas G (Figura 8, Grove-Strawser *et al.*, 2010; Micevych *et al.*, 2017). Además, se ha propuesto que la señalización que lleva a los receptores de E<sub>2</sub> a expresarse en la membrana es a través de la adición de un grupo palmitoil (Micevych *et al.*, 2017). El receptor GPER-1 también se ha encontrado expresado en la membrana de las MSN (Almey *et al.*, 2016).



**Figura 8.** Mecanismo de acción propuesto para el E<sub>2</sub> en el núcleo estriado y el hipocampo. Se muestra la participación de diferentes proteínas de andamiaje y la proteína G activada tras la activación (Modificado de Grove-Strawser *et al.*, 2010)

Por otra parte, existen pocos estudios que muestren la presencia del RP en las MSN's. Ke & Ramirez (1990) mediante ensayos de unión a radioligando de P<sub>4</sub>-BSA, demostraron que esta hormona puede unirse en la membrana de las neuronas del NE. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha detectado este receptor en la superficie membranal de las MSNs en humanos (Sazdanovic *et al.*, 2013).



## 2.2. Efectos del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre la conducta y las MSNs.

### 2.2.1. Conducta

Durante el ciclo estral en la rata intacta, las concentraciones sanguíneas del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> se encuentran dentro de los rangos de 21-158 pM (o hasta 367 pM, Cornil *et al.*, 2006) y 10-48 nM, respectivamente (**Tabla 1**). La conducta sexual proceptiva y receptiva en la rata intacta se expresa durante el proestro-estro, cuando los niveles sanguíneos del estradiol y de la progesterona son elevados (McGinnis & Pfaff, 2012).

El modelo de la rata OVX tratada con E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> replica los efectos conductuales que se observa durante la fase de proestro-estro (**Tabla 1**); y es empleado para el estudio de mecanismos neuroendócrinos y sobre como las manipulaciones farmacológicas pueden regular dichos comportamientos (Jones *et al.*, 2013). En nuestro diseño experimental, la rata OVX esta tratada con una dosis “*priming*” de benzoato estradiol (BE<sub>2</sub>, 5 microgramos) 48 horas antes de recibir una dosis de E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub>, estímulo que induce las conductas de estro (proceptividad y lordosis; Jones *et al.*, 2013; Yoest *et al.*, 2014; Domínguez-Ordoñez *et al.*, 2015).

El NE ha cobrado relevancia como regulador de la conducta sexual puesto que es un sustrato neuronal crucial para la expresión de conductas motivadas (Yoest *et al.*, 2014). Algunos modelos experimentales muestran que la lesión bilateral en el estriado ventral reducen las conductas *proceptivas* en las hembras, sin embargo, no reducen la incidencia de lordosis (Moor *et al.*, 2019; Rivas & Mir 1990). Recientemente, se ha mostrado que la administración intraventricular de la P<sub>4</sub> 48 horas después del *priming* facilita la proceptividad, así como el reflejo de lordosis, mientras que el E<sub>2</sub> administrado por la misma vía induce la lordosis, pero no la proceptividad (Domínguez-Ordoñez *et al.*, 2015).

El glutamato juega un papel elemental en la regulación de las MSNs. En la figura 3 y 4, se muestran las vías y/o proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza que se integran en el NE. En modelos animales de roedor, se ha demostrado que las neuronas piramidales de la corteza prefrontal media (CPFm) emite proyecciones que hacen sinapsis con el NAcc. La CPFm regula las respuestas asociadas a emociones y a la información exteroceptiva con contenido motivacional relevante para el individuo; un desbalance en este sistema lleva a que las respuestas frente a emociones o situaciones de amenaza sean incontroladas (Valdés & Torrealba, 2006). La activación de dicho circuito en hembras es fase de proestro-estro, nos sugiere una respuesta

anticipada ante una recompensa, en este caso, la gratificación sexual. La inhibición de estas proyecciones de la CPFm decremantan la activación del NAcc y con ello las conductas proceptivas, mientras que la conducta de lordosis no se ve modificada. Estos hallazgos proponen un control motivacional del comportamiento sexual de las hembras por parte de la CPF; sin embargo, el papel de la neurotransmisión glutamatérgica en los procesos de la conducta proceptiva no ha sido muy profundizado (Moor *et al.*, 2019). Colectivamente, estos estudios sugieren un modelo donde las funciones de las subregiones del estriado están ligadas potencialmente con la combinación de la acción glutamatérgica (Proano, 2020)

### **2.2.2. Efecto del E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sobre las MSNs: Experimentos en preparaciones *in vivo*.**

En varios estudios se ha demostrado que las MSNs son sensibles a las fluctuaciones hormonales, pues pueden modificar la densidad de espinas dendríticas, permitiendo una mayor conectividad en este núcleo en las fases de proestro-estro (Krentzel & Meitzen, 2018); por lo tanto se ha incluido al NE como un área sexualmente dimórfica funcionalmente (Forlano & Woolley, 2010), a pesar de no presentar diferencias morfológicas en el soma ni mayor densidad neuronal en el núcleo (Meitzen *et al.*, 2011; Krentzel & Meitzen, 2018).

Además de este dimorfismo, las propiedades electrofisiológicas de las MSNs son reguladas de diferente forma según la subregión, dorsal o ventral del NE y al mismo tiempo, se ven influenciadas por la edad del individuo. Diversos autores (se resumen en la **tabla 2**) indican que las MSN's del NE y NAcc de ratas prepúberes hembras, muestran un incremento en la excitabilidad neuronal atribuida a las propiedades intrínsecas de la célula, pues exhiben un aumento en los potenciales de acción y en la frecuencia de los potenciales sinápticos excitatorios comparadas con los machos (Cao *et al.*, 2018).

**TABLA 2 | Diferencias ligadas al sexo y edad en las propiedades electrofisiológicas de las MSN's en las diferentes regiones estriatales**

Propiedad Electrofisiológica	Etapa del Desarrollo	Caudado-Putamen	Núcleo Accumbens Core	Núcleo Accumbens Shell
Excitabilidad neuronal intrínseca	Pre pubertad	Hembras > machos	Hembras = machos	Hembras = machos
	Adulthood	? <sup>a</sup>	?	?
Entradas sinápticas excitadoras	Pre pubertad	Hembras = machos	Hembras > machos	Hembras = machos
	Adulthood	? <sup>a</sup>	Hembras > machos <sup>b</sup>	Hembras = machos (? <sup>b,c</sup> )

?<sup>a</sup>-Las MSN's de ratas adultas, muestran un incremento de excitabilidad *in vivo* en hembras comparadas con machos, pero los mecanismos subyacentes a este fenómeno permanecen desconocidos por lo que no se incluyen en esta tabla.

?<sup>b</sup>- Los animales utilizados fueron intactos (sin gonadectomía) pero el ciclo estral de las hembras no fue examinado

?<sup>c</sup>- La mayoría, pero no toda la literatura sobre el Accumbens Shell, no muestra diferencias ligadas al sexo o sensibilidad a los estrógenos en las entradas sinápticas excitatorias en animales no expuesto a estímulos ambientales adversos

? - Datos no disponibles o incompletos

El color verde significa la presencia de diferencias atribuidas al sexo, el rojo, datos por conocer.

**Modificado de Cao *et al.*, 2018**

Arnauld (*et al.*, 1981) y Tansey (*et al.*, 1983) utilizando diferentes herramientas de estudio electrofisiológico (iontoforesis y registro unitario respectivamente) demostraron que tanto el E<sub>2</sub> implantado de forma subcutánea, como un derivado de esta hormona, el benzoato de estradiol (BE<sub>2</sub>) en ratas OVX aumentan la frecuencia de disparo de las neuronas del neostriado. Tansey, además comparó este efecto con respecto a machos sometidos al mismo tratamiento y mostró un aumento significativo en la actividad neuronal, sugiriendo una modulación sobre las neuronas espinosas medianas ligada al sexo.

### 2.2.3 Efecto del E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sobre las MSNs: Experimentos en preparaciones del NE en rebanada / tejido *in vitro*.

La P<sub>4</sub> también regula la actividad de las neuronas estriatales de ratas hembras OVX pretratadas con BE<sub>2</sub>. En una serie de experimentos con estudios de HPLC en rebanadas del estriado, se demostró que la perfusión de esta hormona facilita la liberación de DA, y que el efecto es mayor después de un pretratamiento con E<sub>2</sub> (Yoest *et al.*, 2018); Este efecto fue

bifásico, puesto que después del pico máximo de la P<sub>4</sub>, la de concentración de DA decreció, hecho que coincide con el término de la conducta de proestro-estro.

También se planteó la posibilidad de un mecanismo no genómico debido a que el efecto persiste tras unir la P<sub>4</sub> a albúmina (P<sub>4</sub>-BSA), proteína que no permite la difusión de la hormona al interior de la célula (Dluzen & Ramírez 1984, 1989, 1990). Este aumento en la liberación de DA y el efecto de incremento de la frecuencia de disparo de las MSNs se correlaciona con una conducta *proceptiva* y prepara al sujeto para asegurar las conductas receptoras. Además, este neurotransmisor juega un papel de aprendizaje y reforzamiento de una tarea al generar un proceso asociado a una recompensa (Yoest *et al.*, 2014; 2018).

#### **2.2.4. Efecto del E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> sobre las MSNs: Experimentos en preparaciones de MSNs aisladas.**

Algunos estudios han demostrado que el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> modulan directamente y en milisegundos a las MSNs. Mermelstein (*et al.*, 1996) estudió la actividad eléctrica dependiente de voltaje en las neuronas disociadas del NE de ratas prepúberes (4 semanas) y de cultivos celulares de ratas neonatas; Empleando la técnica de *patch clamp* en configuración de célula completa, demostró que la concentración fisiológica de 100 pM de E<sub>2</sub>, reduce rápidamente la entrada de corriente de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales tipo L dependientes de voltaje. Sus resultados muestran que el efecto es a nivel membranar, debido a que el efecto es replicado la célula es expuesta a E<sub>2</sub>-BSA y, además, esta diferencia está ligada al sexo, puesto que el E<sub>2</sub> fue más efectivo en reducir el flujo de iones Ca<sup>2+</sup> en MSN's de ratas hembras que en las de los machos.

Luoma (*et al.*, 2011) utilizó el modelo experimental y electrofisiológico empleado por Mermelstein en 1996, para evaluar el efecto de la P<sub>4</sub> aplicada extracelularmente sobre los cultivos celulares de MSN's de ratas neonatas (posnatal 0 y 1); y se demostró que la corriente de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje, disminuye en un 70% en presencia de una concentración de uso terapéutico de 50 μM de P<sub>4</sub> y que dicho efecto es reversible. Además, evaluó el efecto de algunos metabolitos de la P<sub>4</sub> como la allopregnanolona y la pregnenolona sobre estas MSN's y no tuvieron un efecto significativo comparado con el grupo control; esto sugiere que la reducción de la corriente de Ca<sup>2+</sup> está regulada de manera esteroide-específica. Además, determinó que este efecto es debido a la interacción de la P<sub>4</sub> con un receptor membranar debido a que dicha hormona se añadió a la solución interna del registro, y no hubo efecto sobre la corriente de Ca<sup>2+</sup>.

El hecho de que tanto el E<sub>2</sub> como la P<sub>4</sub> modulen la actividad de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje en cuestión de milisegundos, sugiere que hay una regulación hormonal “no clásica” (que no involucra la de novo síntesis de proteínas) a nivel membranar; además de que nos sugieren que existe una interacción entre estas hormonas y las regiones de estudio.

Resultados similares fueron reportados empleando cromatografía de líquidos (HPLC), ya que se determinó que el E<sub>2</sub> en concentraciones fisiológicas aumenta la liberación de dopamina (DA) en neuronas cultivadas del NE de ratas hembra OVX y no en los machos, asimismo se planteó la posibilidad de un mecanismo a nivel membranar (Becker, 1990).

Estos antecedentes nos muestran la importancia de entender los procesos que subyacen a la modulación de neurotransmisores, como el glutamato, directamente sobre los receptores membranales de las MSNs, en la regulación de las conductas proceptivas de la rata hembra. Con lo reportado hasta este momento en la literatura, y considerando los múltiples factores que podrían estar regulando la actividad del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> (como la edad y el sexo), el presente trabajo se centró en el estudio de neuronas obtenidas de ratas en etapa adulta con un sistema reproductor maduro, que ocurre alrededor de los 30 a 40 días de vida cuando aparecen patrones específicos de liberación de la hormona LH cada 30-60 minutos (Galassi-Geréz & Gullace2004). Para asegurar el desarrollo fisiológico de la cepa, la ovariectomía se realizó posterior a ese periodo (ver más adelante en el apartado metodología). Otra diferencia importante en nuestro estudio es el empleo de la técnica *patch-clamp* en configuración de célula completa, el estudio de corrientes iónicas en células aisladas. Esto nos permite estudiar específicamente la respuesta de la molécula sobre un soma celular, sin interacción con otros tipos celulares que pudiesen estar segregando otras sustancias que regulen su actividad. Sin embargo, la expresión de una conducta no es el resultado de la fosforilación/inactivación de un receptor, sino de una compleja interacción entre las vías de señalización, que modulan varios procesos celulares y fisiológicos (González-Flores *et al.*, 2015). Un propósito central del presente trabajo fue desarrollar un modelo para explorar mecanismos celulares que subyacen dichos eventos celulares del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub>. Por ello, este trabajo se enfocó en caracterizar los efectos del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre una respuesta neuronal *específica* – la corriente del receptor glutamatérgico tipo NMDA – en neuronas MSN’s aisladas de las subregiones del estriado (NE).

### 3. HIPÓTESIS

El estradiol ( $E_2$ ) y la progesterona ( $P_4$ ) modulan la corriente de NMDA de las neuronas espinosas medianas en el estriado en un modelo de conducta sexual de la rata.

#### **Predicciones**

- 1) El  $E_2$  y la  $P_4$  modulan la corriente NMDA de las MSNs agudamente disociadas del estriado de ratas OVX.
- 2) El  $E_2$  y la  $P_4$  tienen sus efectos sobre la corriente NMDA dentro de un rango de concentración fisiológica semejante al rango presente durante el ciclo estral de ratas hembras intactas.
- 3) El  $E_2$  y la  $P_4$  actúan de manera rápida (segundos-minutos), característica de efectos no-genómicos.
- 4) El efecto del  $E_2$  y la  $P_4$  sobre la corriente activada por NMDA en neuronas MSN disociadas, será diferencial dependiendo en la subregión de origen y dosis dependiente.
- 5) Dado que la respuesta conductual (la conducta sexual femenina) de la rata OVX al  $E_2$  o a la  $P_4$  depende en una dosis “*priming*” de  $BE_2$ , las MSNs provenientes de ratas OVX responden de manera diferencial a estas hormonas, dependiendo si recibió o no el pretratamiento con  $BE_2$ .

## 4. OBJETIVOS

### General

Determinar el efecto de tres variables independientes (la hormona, la subregión del estriado, y el pretratamiento con BE<sub>2</sub>) sobre la corriente activada por NMDA, en neuronas espinosas medianas disociadas del estriado de la rata ovariectomizada.

### Específicos

- 1) Caracterizar la dosis dependencia de los efectos del estradiol y la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas espinosas medianas.
- 2) Determinar si las neuronas espinosas medianas provenientes de tres subregiones del estriado (dorsolateral, accumbens *Core* y accumbens *Shell*) responden al estradiol y a la progesterona de manera diferencial mediante la comparación de las curvas dosis respuesta.
- 3) Determinar si el pretratamiento con BE<sub>2</sub> modula la respuesta de las neuronas espinosas medianas al estradiol y a la progesterona.

## 5. METODOLOGÍA

Los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los experimentos se realizaron en ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley (SD) de 45-50 días de edad procedentes del Bioterio “Claude Bernard”. Este protocolo fue revisado y aprobado por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) mediante la Vicerrectoría de Investigación y estudios de Posgrado con el oficio VIEP/3110/2018. Todos estos organismos pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

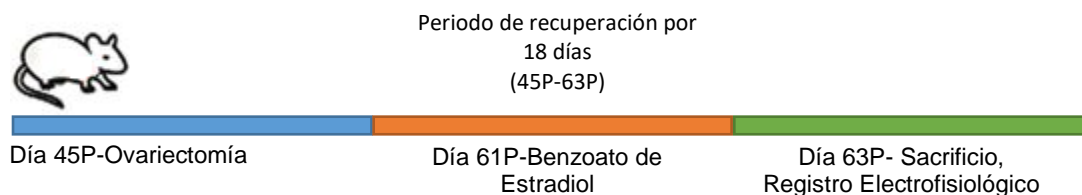
### **Ovariectomía.**

*Cirugía.* Las ratas hembras SD fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina-xilacina a una dosis 0.20ml/100g administrada por vía intraperitoneal. Posteriormente fueron rasuradas en el abdomen, desde la apófisis xifoides hasta el pubis. A continuación, se desinfectó dicha región con benzal y se aplicó localmente clorhidrato de lidocaína, consecutivamente se realizó una incisión de 1 cm de longitud en el tercio medio del abdomen caudal, a la altura de la línea media. Enseguida se identificó el cuerno uterino derecho y se extrajo el ovario; inmediatamente se ligó el cuerno uterino con sutura de ácido poliglicólico (cuatro cero, Atramat) y posteriormente se cortó el ovario con una tijera Mayo. El mismo procedimiento fue seguido para la extracción del ovario izquierdo; los cuernos uterinos se recolocaron en el abdomen. Finalmente, la capa muscular y la piel fueron suturadas con un punto en “U” mediante el uso de la misma sutura (Modificado de Domínguez-Ordóñez, 2017).

*Cuidados Postoperatorios.* Durante la recuperación de la anestesia, los animales recibieron calor externo por medio de una lámpara, colocada a 45 centímetros de distancia y se mantuvieron así hasta que adoptaron un estado completamente ambulatorio (habilidad del animal para reincorporarse sobre sus cuatro patas, después de haber sido colocado en decúbito dorsal). Con la finalidad de disminuir el dolor y la inflamación durante el periodo postoperatorio, cada rata fue inyectada con Ketoprofeno 0.10ml/100g cada 24 horas durante 3 días por vía subcutánea. El antibiótico empleado para la prevención de infecciones fue Enrofloxacin a una dosis de 0.10ml/100g cada 24 horas durante 3 días por vía subcutánea. Además, recibieron una



curación diaria de la herida con el antiséptico y germicida Iodopovidona. El médico veterinario responsable de la capacitación y supervisión del proyecto fue el MVZ. Francisco Ramos Collazo, director del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y cuya cédula profesional es 6519572. Se les permitió recuperarse de la cirugía 18 días antes de proceder al experimento (**Figura 9**).



**Figura 9.** Esquema de la metodología para este estudio. Las ratas hembras Sprague-Dawley fueron ovariectomizadas al día posnatal 45, y durante el periodo de recuperación, fueron administradas con una dosis única de Benzoato de estradiol 48 horas antes de proceder con el registro electrofisiológico.

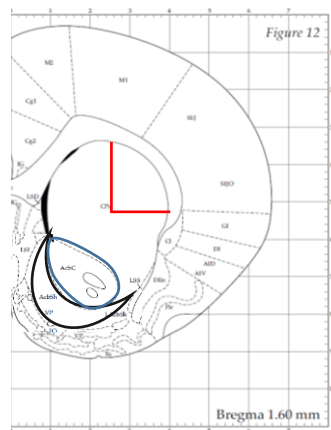
## 5.1 Diseño experimental

*Grupos experimentales.* Todas las hembras usadas para este estudio tuvieron un rango de edades del día 45-50 posnatal y después de la recuperación de la cirugía de ovariectomía, cuando llegaron a una edad de 63 días fueron sacrificadas. Las ratas fueron asignadas a dos grupos experimentales: (1) Grupo no tratado, donde las hembras no recibieron la administración de ningún fármaco previo al sacrificio y (2) el grupo pretratado, donde las hembras, al tener una edad de 61 días (48 horas previo al sacrificio), se les administró por medio de una inyección subcutánea de 5µg de BE<sub>2</sub>. La dosis “*priming*” de BE<sub>2</sub> es parte de un tratamiento hormonal que se ha utilizado extensivamente en la rata ovariectomizada para reproducir las conductas de proestro-estro (Kauffman & Micevych, 2018; González-Flores *et al.*, 2015). Se ha establecido que 48 horas después de administración, los circuitos neuronales que subyacen la conducta de estro responden a la progesterona o el estradiol (González-Flores *et al.*, 2015).

*Disociación Aguda.* El protocolo de disociación empleado previamente descrito por Flores- Hernández *et al.*, (2009), se describe a continuación con algunas modificaciones: las ratas fueron anestesiadas con halotano y posteriormente decapitadas. Los cerebros fueron disecados rápidamente y se colocaron en solución fría de Isetionato con bajo Ca<sup>2+</sup> (en mM):140

Isetionato de NaCl, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 23 glucosa, 15 HEPES, pH 7.4, 300-310 mOsm/L y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 N-G-nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, y gaseada con O<sub>2</sub>.

Después se obtuvieron rebanadas coronales del cerebro de 350 µm con ayuda de un vibratomo (Campden) mientras están sumergidas en la misma solución. De las rebanadas obtenidas, se disecaron las zonas *Core* y *Shell* del NAcc (Bregma 2.2 a 0.7 mm) y el estriado dorsolateral (Bregma 1.6 a -0.26 mm; Paxinos & Watson, 1997, **figura 10**).



**Figura 10.** Esquema de un corte coronal del cuerpo estriado en las coordenadas indicadas por el atlas de cerebro de rata, donde se observan delimitadas las tres áreas utilizadas para este estudio. En rojo se señala al estriado dorsolateral, en azul la región *core*, y en negro la porción *shell* del Núcleo Accumbens (Paxinos y Watson, 1997)

Posteriormente las rebanadas disecadas fueron mantenidas mínimo 1 hora a temperatura ambiente, en solución salina balanceada de Earl (EBSS, SIGMA) amortiguada con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico (para que la célula obtenga ATP), 0.005 glutatión (agente antioxidante), 0.1 N-G -nitro-L-arginina (inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal) y 1 ácido kinurénico (antagonista del sitio de unión del coagonista en la subunidad GluN1 para evitar los efectos excitotóxicos del glutamato); burbujeada con 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/L. Este tiempo permite a las neuronas embebidas en las rebanadas que se estabilicen y que los suplementos mencionados ejerzan su acción y minimicen los efectos derivados del método de obtención, pues las células aledañas a la zona de estudio son lesionadas.

Después de la incubación se tomó una rebanada del Accumbens *Core*, *Shell* o del estriado dorsolateral para su tratamiento enzimático, el cual se realizó en una cámara de cultivo de 40 ml con solución salina balanceada de Hanks (HBSS, SIGMA) amortiguada con HEPES burbujeada con O<sub>2</sub>, conteniendo 0.75 mg/ml de papaína (Calbiochem) a 35 ± 2 °C y

suplementada con (en mM): 1 ácido pirúvico, 0.005 glutatión, 0.1 NG–nitro-L-arginina, 1 ácido kinurénico, durante 13 minutos. Transcurrido el tiempo de la digestión enzimática, el tejido se lavó con la solución de Isetionato y posteriormente disociado mecánicamente con pipetas Pasteur de diferentes calibres (pulidas al fuego). La suspensión de células se colocó en cajas Petri de 35 mm (Nunc Surface, NUNC) montadas en el microscopio de registro. Después de 10 minutos, la suspensión fue perfundida y lavada con una solución de fondo (en mM): 140 NaCl, 23 Glucosa, 15 HEPES, 2 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub> y 1% rojo fenol, burbujada con O<sub>2</sub>, pH = 7.4 ajustado con NaOH, 300-310 mOsm/L; para su posterior registro por medio de la técnica de fijación de voltaje en configuración de célula completa.

## **5.2 Registro electrofisiológico.**

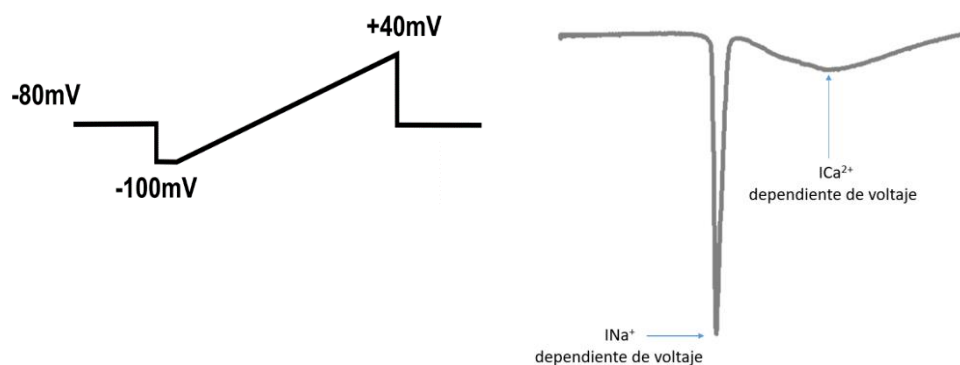
*Técnica de fijación de voltaje en célula completa (Whole-cell).* Para esta técnica, los capilares de registro fueron obtenidos de tubos de borosilicato (WPI1B120F-4, Sarasota FL) utilizando un equipo Micropipette Puller Modelo p-97, (Sutter Instrument Co). La solución interna para los registros de corriente está compuesta de (en mM): 175 N-Metil-D-Glutamina (NMDG), 40 HEPES, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA), 12 fosfocreatina, 3 Na<sub>2</sub>ATP, 0.35 Na<sub>3</sub>GTP, 0.1 leupeptina, pH = 7.25 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 265-270 mOsm/L. La solución externa compuesta de (en mM): 127 NaCl, 20 CsCl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 12 glucosa, 10 HEPES, pH = 7.4 con NaOH, 300-305 mOsm/L.

Los registros se obtuvieron con un amplificador para fijación de voltaje (voltage clamp) Multiclamp 700 A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) y un digitalizador Digidata 1440A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), controlados con el programa pClamp Versión 9 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ejecutándose en una computadora con procesador tipo Pentium IV (1.5GHz), 1 GB de memoria RAM y sistema operativo Windows XP SP3. La resistencia de los capilares de registro en el baño fue de 4-6 M $\Omega$ . Después de la ruptura del sello, la resistencia serial fue menor a 25 M $\Omega$ . Una resistencia mayor no representa fidedignamente el efecto del fármaco de estudio ya que las corrientes censadas por el electrodo de registro pueden decrementar debido a un incremento en la resistencia y enmascarar el efecto. Por lo tanto, cuando el cambio de la resistencia serial fue mayor, se descartó para el estudio esa neurona. El potencial de mantenimiento de membrana fue de -80mV en el protocolo de

generación de corriente de NMDA. Las neuronas espinosas medianas fueron identificadas primeramente por la disección de la subregión correspondiente con ayuda del atlas “El cerebro de la rata en coordenadas estereotáxicas” (Paxinos *et al.*, 1998); en segundo lugar, fueron identificadas por su morfología y finamente por su capacitancia membranal, que es menor a 10 picofaradios en la metodología de *whole-cell* (Mermelstein *et al.*, 1996)

*Protocolos electrofisiológicos.* Los protocolos empleados para el registro fueron:

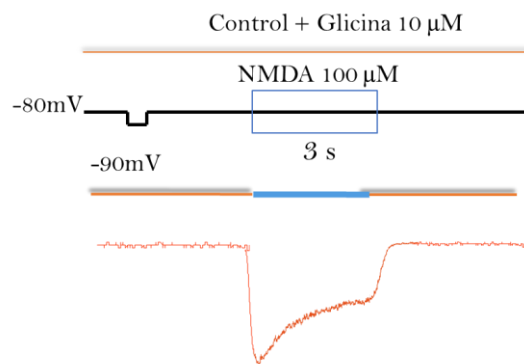
A) *Rampa* (-100 mV a +40 mV) con una duración de 100 ms para generar las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje. Este protocolo tiene la finalidad de evaluar la viabilidad de la membrana celular. Cuando la célula no responde al cambio súbito de voltaje o los trazos obtenidos son inestables, no se presentan ninguna de las corrientes características y esto es indicativo de que la membrana no está en condiciones óptimas de regular la actividad eléctrica, por lo que la célula es descartada para el siguiente protocolo de registro.



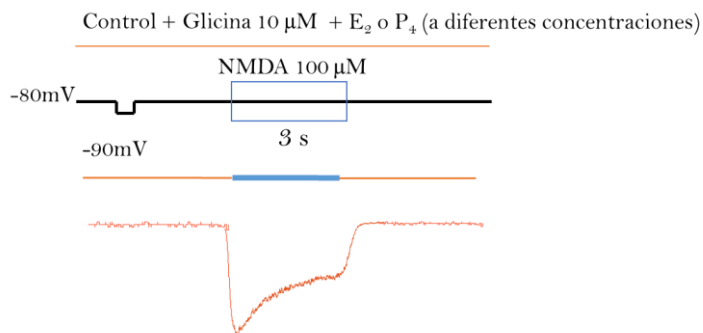
B) *Aplicación de NMDA, Estradiol ( $E_2$ ) y Progesterona ( $P_4$ ).* Todo el procedimiento experimental se realizó en presencia de  $10\mu\text{M}$  de glicina, coagonista del receptor NMDA. Las concentraciones a probar de  $E_2$  y  $P_4$  se prepararon el día del experimento y se coaplicaron cada una a la vez con el fármaco NMDA. Este protocolo tiene una duración total de 15 segundos por trazo, de los cuales 3 segundos son para la aplicación del neurotransmisor NMDA y evocar la corriente de estudio, es decir, la aplicación de  $E_2$  y  $P_4$  antes de la generación de la corriente de NMDA fue de 12 segundos previos y también se coaplicó durante la generación de la corriente. Se establecieron tres condiciones experimentales en cada neurona: (1) control, (2) efecto y (3) lavado. De cada

condición experimental se obtuvieron de 5-10 trazos *estables* al pico de la corriente y posteriormente se promediaron los trazos. Se fijó a la neurona espinosa mediana, a un potencial de mantenimiento de -80 mV.

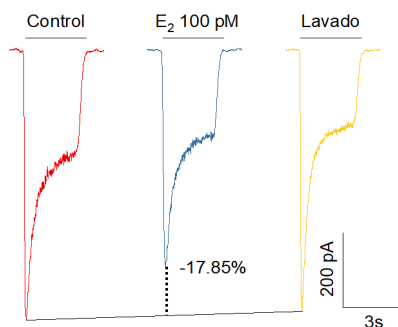
1. *Condición INMDA control.* Para generar la corriente de estudio (INMDA) se aplicó NMDA a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  durante 3s. En cada trazo se aplica un pulso de prueba de -10mV, esto con la finalidad de evaluar la resistencia del sello entre la membrana y la micropipeta (mayor a 1G $\Omega$ ).



2. *Condición efecto.* En esta condición, se generó la INMDA en presencia de las diferentes concentraciones de  $\text{E}_2$  y  $\text{P}_4$  estudiadas. El  $\text{E}_2$  fue aplicado en las siguientes concentraciones en el orden picomolar (pM): 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 y 0.1. Las concentraciones de  $\text{P}_4$  probadas fueron en el orden nanomolar (nM): 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3 y 0.1. Estas concentraciones corresponden al rango fisiológico del ciclo estral de la rata. A cada MSN se le aplicó en promedio 4 concentraciones aleatorias de  $\text{E}_2$  o  $\text{P}_4$ . No se aplicaron las hormonas juntas.



3. *Condición lavado.* Esta condición experimental es generada inmediatamente después a la exposición de la hormona de estudio para evaluar si el efecto es reversible. La INMDA es generada en condiciones similares a las del inciso 1.



Las condiciones 1, 2 y 3 se aplicaron a cada neurona estudiada para posteriormente calcular el porcentaje de cambio de la corriente de NMDA ejercido por cada concentración aplicada de la hormona. La fórmula es:

$$\text{PORCENTAJE} = 1 - \left( \frac{\text{EFECTO}}{\text{CONTROL + LAVADO}} \right) \times 100$$

Donde se tomó el valor del pico máximo de la corriente (en pA) del promedio de 5-10 trazos estables de la INMDA:

Efecto = en presencia de cada concentración de estudio de E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub>

Control = en ausencia de E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub>

Lavado = después del protocolo denominado *efecto*, donde hubo una exposición a E<sub>2</sub> o P<sub>4</sub>.

### 5.3 Análisis estadístico

Se midió la amplitud al pico de la corriente activada por NMDA en picoamperios (pA). Los datos son expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M) de cada uno de los grupos. Los ajustes y gráficas fueron realizados en los programas Origin Pro 2017 y Sigma Plot 11.0. Para caracterizar la dosis dependencia de los efectos ejercidos por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, en las gráficas se muestran los valores de la media  $\pm$  el error estándar de cada concentración en escala

logarítmica, (en por lo menos 3 diferentes neuronas de cada subregión). Estos datos fueron ajustados a una ecuación sigmoidea tipo dosis-respuesta dada por la ecuación:

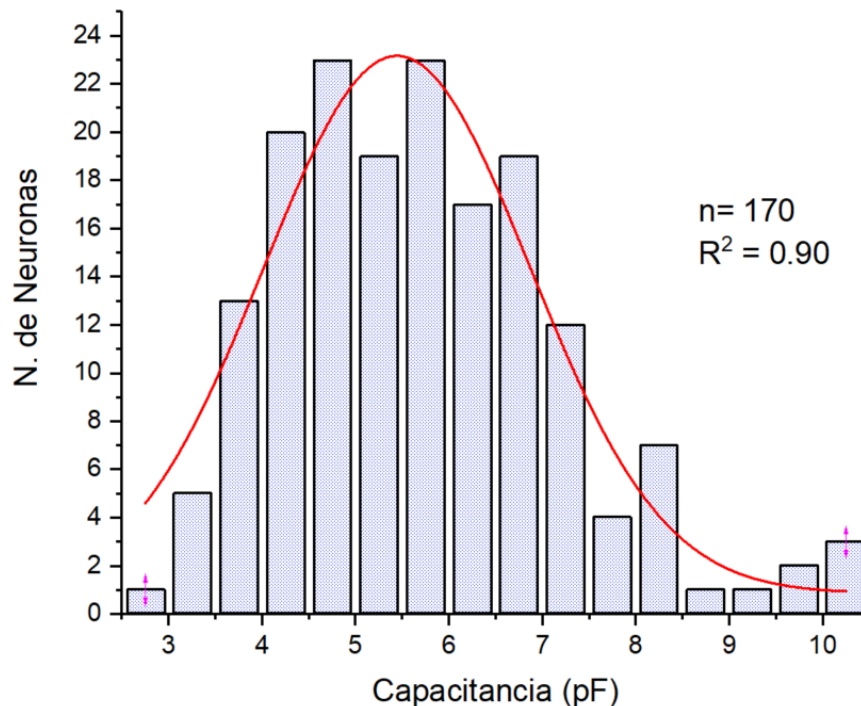
$$y = A1 + \frac{A2-A1}{(1 + 10^{((\text{LOG}x0-x)*p))}}$$

Dónde: A1 = Efecto mínimo, A2 = Efecto máximo, X= valor de la concentración,  $10^{\text{LOG}x0} = \text{EC}_{50}$  y p = pendiente o coeficiente de Hill, para obtener la concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) y el efecto máximo ( $\text{Emáx}$ ) en cada una de las áreas de estudio. Estos parámetros nos permiten conocer si la concentración para llegar al 50% del efecto es diferente en cada área y además en que subregión existió un mayor efecto (numérico).

Para determinar el efecto de la subregión estriatal (DSL, AcbC y AcbS) y las concentraciones de estudio, se aplicó una ANOVA de dos vías tomando como factores independientes la “región” y la “concentración” de estudio. Se analizaron por separado los grupos con y sin la administración sistémica del pretratamiento con BE<sub>2</sub>. El factor “concentración” consta de 8 niveles (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM para E<sub>2</sub> y nM para P<sub>4</sub>) y el factor “región” posee 3 niveles (DSL, AcbC y AcbS). Determinamos los efectos principales de los factores independientes, así como la interacción entre los mismos, por medio de la aplicación de la prueba del modelo lineal general (MLG, SPSS software, versión 17.0), y adicionalmente, donde la ANOVA nos indicó un efecto estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ), se aplicó una prueba *post-hoc* de Tukey para determinar que niveles difirieron entre sí. Para cada concentración, se confirmó que la modulación sobre la INMDA fuera significativamente diferente de 0, con una prueba T de Student de una muestra con el software SPSS. Derivado de este análisis, también se muestra el resultado de la eta cuadrada parcial ( $\eta^2p$ ), cuyo valor nos permite evaluar la magnitud de la diferencia entre dos resultados estadísticamente significativos, los valores descritos en la literatura para  $\eta^2p$  son: 0.01=efecto pequeño, 0.09= tamaño mediano, 0.25= efecto grande. La significancia estadística se reportó cuando  $p \leq 0.05$ .

## 6) RESULTADOS

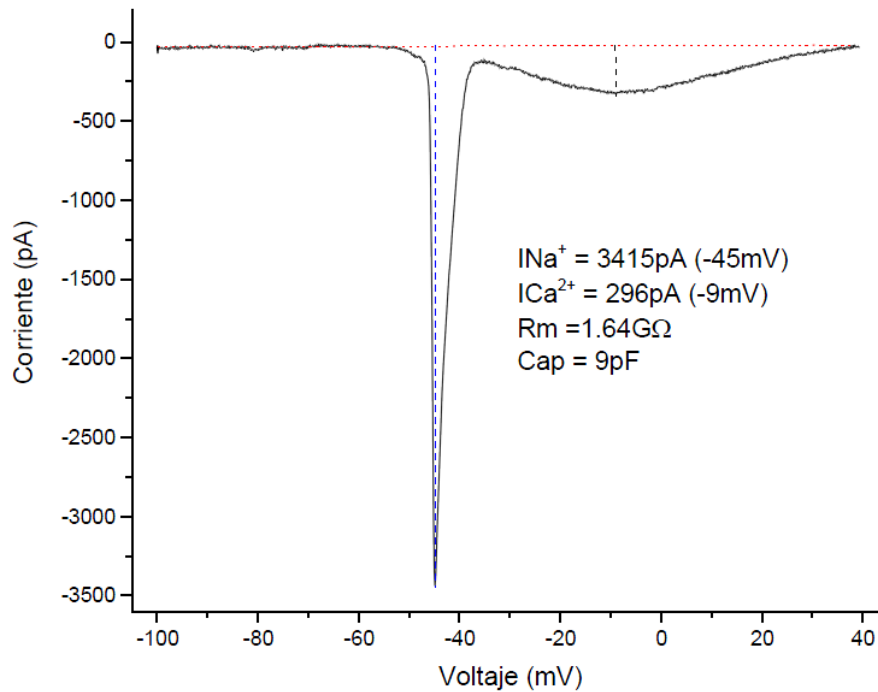
Para este proyecto, se registraron un total de 170 neuronas con los parámetros electrofisiológicos establecidos (resistencia de membrana  $\geq 1G\Omega$  y resistencia de acceso  $< 25M\Omega$ , durante todo el registro) del núcleo accumbens regiones *core* (AcbC) y *shell* (AcbS) y del estriado dorsolateral (DSL), con y sin un pretratamiento con benzoato de estradiol ( $BE_2$ ). Todas las células registradas tuvieron una morfología característica de las neuronas espinosas medianas (MSNs) y las capacitancias obtenidas corresponden al rango 2.5 y 10.5 pF, dato sustentado con lo reportado en la literatura para las MSNs en el protocolo de registro *whole-cell* (Surmeier *et al.*, 1995; Mermelstein *et al.*, 1996). La población neuronal registrada se ajustó a una curva gaussiana con una  $R^2$  de 0.90, indicándonos que existe una distribución normal (gráfica 1).



Gráfica 1) Histograma de la distribución de las capacitancias de las neuronas espinosas medianas registradas en las regiones *core*, *shell* y dorsolateral. En total se graficaron 170 neuronas. La gráfica muestra que la capacitancia de las neuronas de estudio corresponde a un rango entre 2.5 y 10.5pF. Se muestran la moda con valor de 23 entre las capacitancias 4.5-5.5 pF. Se ajustó a una curva de Gauss, cuyo valor de  $R^2$  es de 0.90



Al inicio de cada registro se procedió a realizar una rampa de voltaje de -100mV hasta +40mV con una duración de 100ms para generar las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  producida por la apertura de los canales dependientes de voltaje respectivos, esto con la finalidad de conocer la viabilidad neuronal; En la gráfica 2 se muestra un trazo representativo de dichas corrientes en las neuronas aisladas; cuando se observa una inestabilidad en los trazos o la ausencia de las corrientes, es indicativo de que la célula no es viable para la aplicación del fármaco de estudio, en este caso  $\text{E}_2$  y  $\text{P}_4$ , por lo que la neurona es descartada.



Gráfica 2. Rampa de voltaje. Se graficó el tamaño de la corriente en picoAmperios (pA) con respecto al voltaje del protocolo de rampa. En la imagen se muestra un trazo representativo de las corrientes dependientes de voltaje, obtenido del promedio de varios pasos del protocolo de rampa. En esta neurona el pico máximo obtenido de la corriente de  $\text{Na}^+$  fue a los -45 mV y con una amplitud de la corriente de 3415 pA, mientras que el pico de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  fue a los -9 mV y midió 296pA.

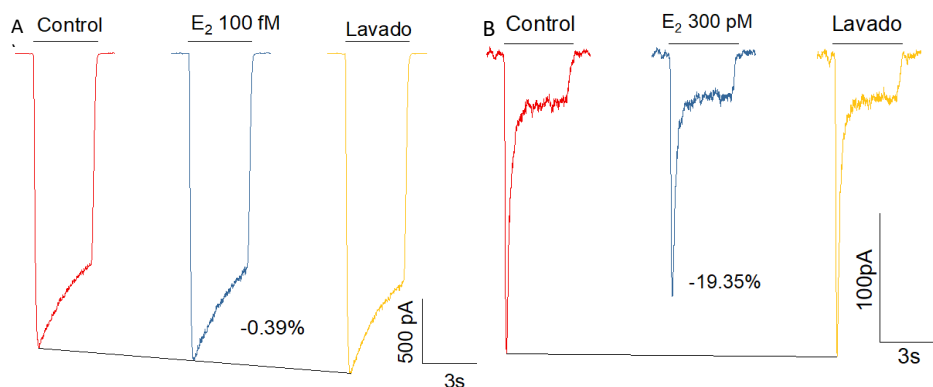
## SECCIÓN 1. Estradiol

### S1.1 Efecto del estradiol sobre la corriente activada por NMDA en neuronas espinosas medianas de ratas pretratadas con benzoato de estradiol

#### S1.1.1 Dorsolateral (DSL)

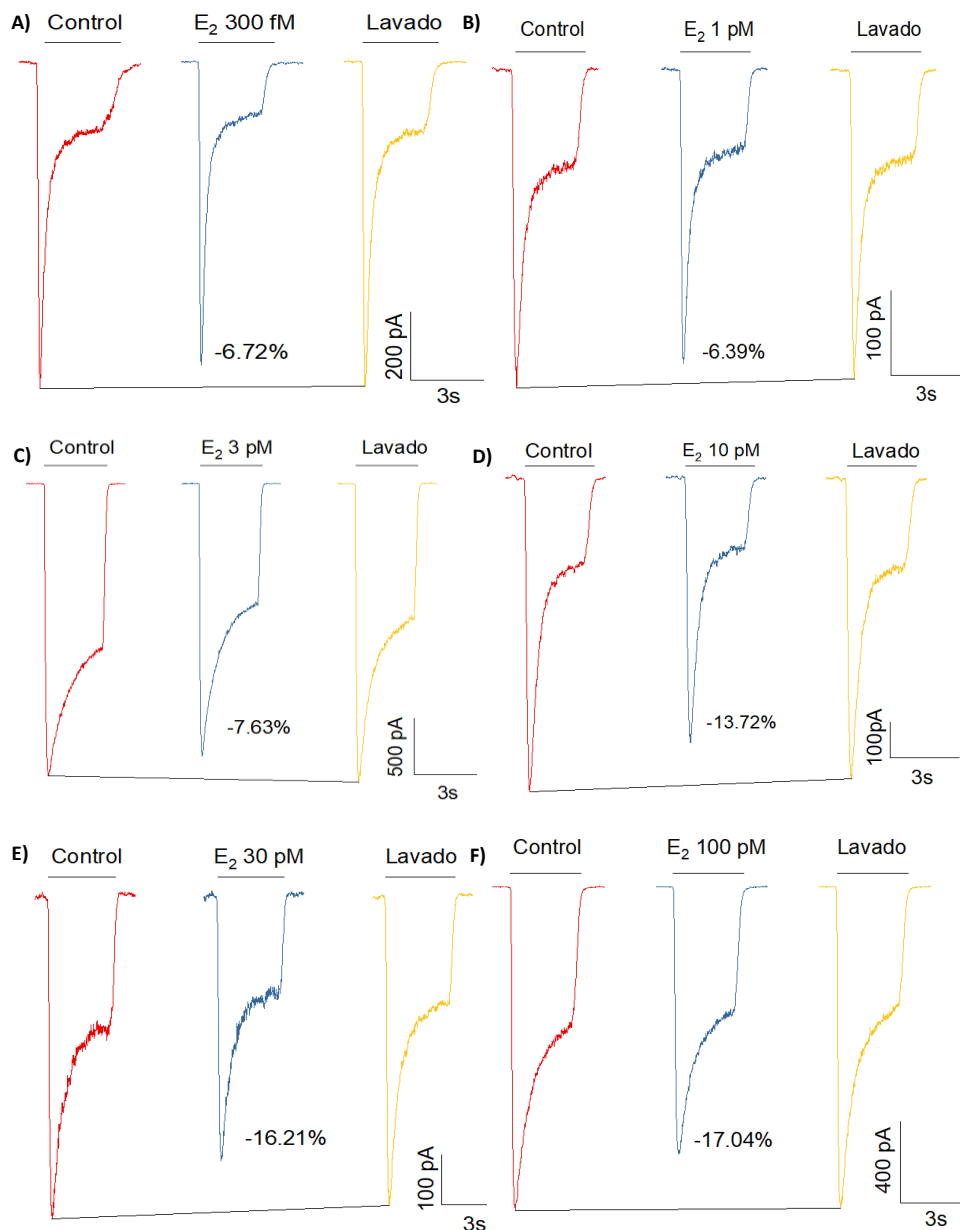
Se aplicaron un total de 8 concentraciones de E<sub>2</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM) sobre la corriente activada por NMDA (INMDA) en 16 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones de E<sub>2</sub> y todas en este grupo experimental indujeron una reducción de la INMDA, los valores se resumen en la tabla 3

Concentración (pM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
<b>0.1</b>	2.75	2.11	5
<b>0.3</b>	6.09	0.50	4
<b>1</b>	6.35	1.44	10
<b>3</b>	8.08	1.74	9
<b>10</b>	10.91	2.85	9
<b>30</b>	14.87	2.22	8
<b>100</b>	19.25	2.69	10
<b>300</b>	19.45	2.35	6



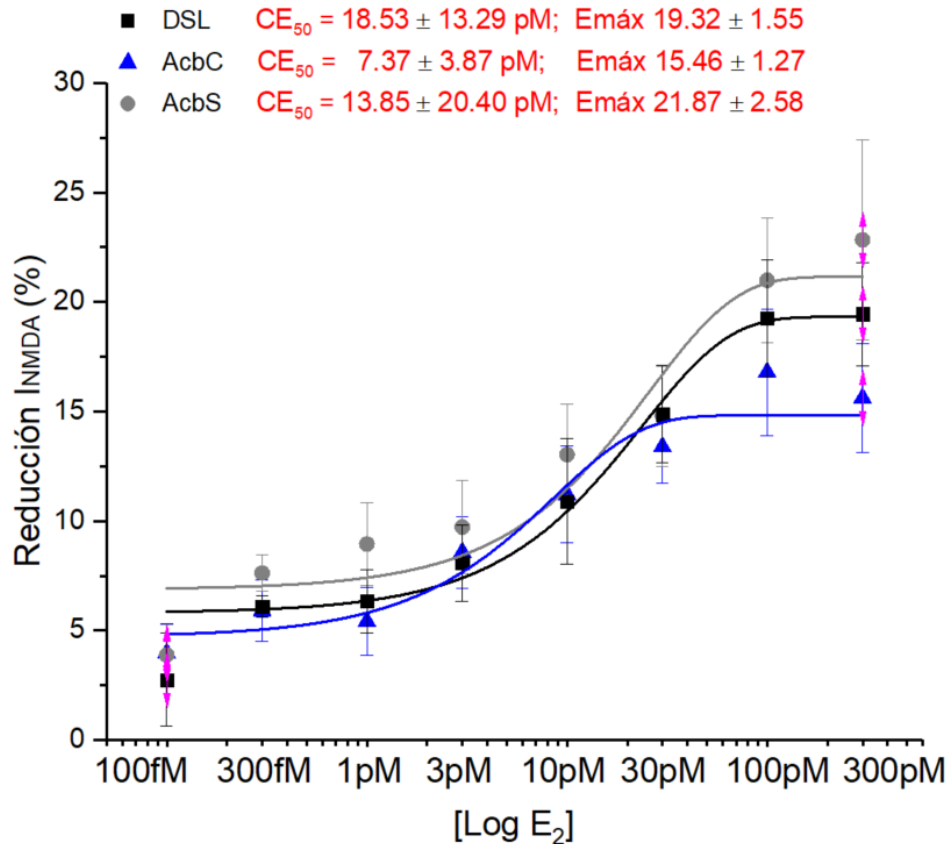
Gráfica 3. Trazos representativos del efecto máximo y mínimo de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en la región dorsolateral del estriado. A. Efecto de la concentración mínima empleada para este estudio, 100 fM, en esta célula redujo un 0.39% la INMDA. B. Efecto de la concentración máxima en este estudio, de 300 pM, en esta célula redujo un 19.35% la INMDA. El efecto fue parcialmente lavable.

Los trazos representativos de todas las concentraciones empleadas en la región DSL, se muestran en las gráficas 3 y 4, en donde se observa que estos efectos fueron parcialmente lavados y dependientes de la dosis.



Gráfica 4. Trazos representativos del efecto de las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 pM de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en la región DSL. En cada inciso se muestra el respectivo porcentaje de reducción obtenido en las diferentes neuronas espinosas medianas registradas. Los efectos fueron parcialmente lavables.

La media aritmética del efecto de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoidal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) de  $18.53 \pm 13.29$  pM, con un ajuste de  $R^2$  de 0.96 (gráfica 5 ■ ).

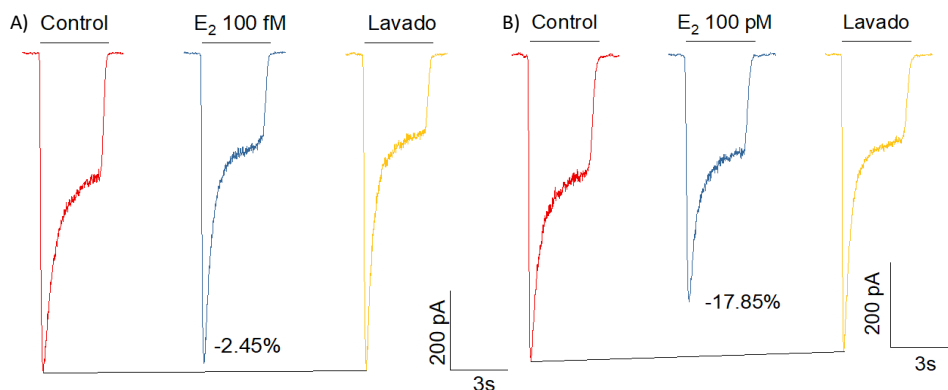


Gráfica 5. Curvas Dosis-Respuesta del efecto de la concentración de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en las tres áreas de estudio. De cada concentración se graficó la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) en escala logarítmica. Numéricamente el mayor efecto del E<sub>2</sub> sobre la INMDA lo encontramos en la región AcbS a una concentración de 300 pM ( $Emáx = 21.87 \pm 2.58$ ) mientras que el menor efecto se observó en la región dorsolateral a una concentración de 100 fM.

### S1.1.2 Núcleo Accumbens Core (AcbC)

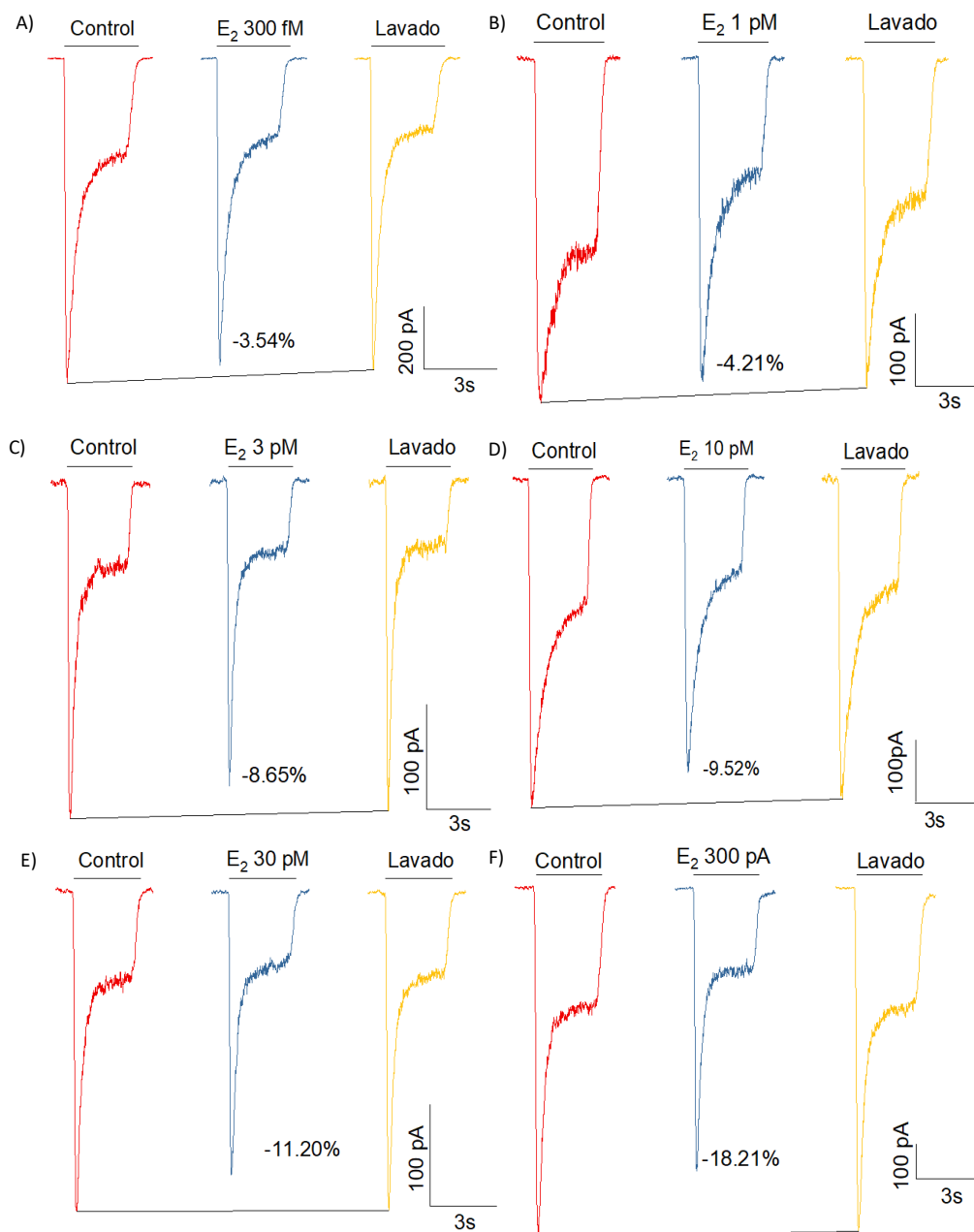
Se aplicaron un total de 8 concentraciones de E<sub>2</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM) sobre la INMDA en 16 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones de E<sub>2</sub> y todas en este grupo experimental indujeron una reducción de la INMDA, los valores se resumen en la tabla 4

Tabla 4. Promedio del efecto de cada concentración de E <sub>2</sub> en el AcbC (pretratamiento con BE <sub>2</sub> )			
Concentración (pM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
0.1	3,97	1,33	4
0.3	5,91	1,39	4
1	4.41	1.53	11
3	8.57	1.62	11
10	11.20	2.20	8
30	13.39	1.65	10
100	16.79	2.89	8
300	15.61	2.50	6



Gráfica 6. Trazos representativos del efecto máximo y mínimo de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en la región AcbC. A. Efecto de la concentración mínima empleada para este estudio, 100 fM, en esta célula redujo un 2.45% la INMDA. B. Efecto máximo de reducción en la concentración de 100 pM, en esta célula redujo un 17,85% la INMDA. El efecto medido fue parcialmente lavable.

Los trazos representativos de todas las concentraciones empleadas en la región AcbC, se muestran en las gráficas 6 y 7, en donde se observa que estos efectos fueron parcialmente lavados y dependientes de la dosis.



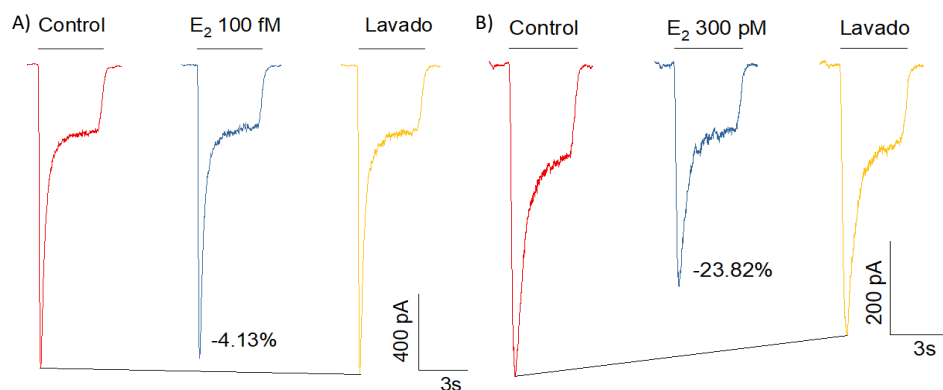
Gráfica 7. Trazos representativos del efecto de las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 300 pM de  $E_2$  sobre la INMDA en la región AcbC. En cada inciso se muestra el respectivo porcentaje de reducción obtenido en cada una de las neuronas espinosas medianas. Los efectos fueron parcialmente lavables.

La media aritmética de los efectos de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) de  $7.37 \pm 3.87$  pM, con un ajuste de  $R^2$  de 0.95 (gráfica 5 ▲).

### S1.1.3 Núcleo Accumbens *Shell* (AcbS)

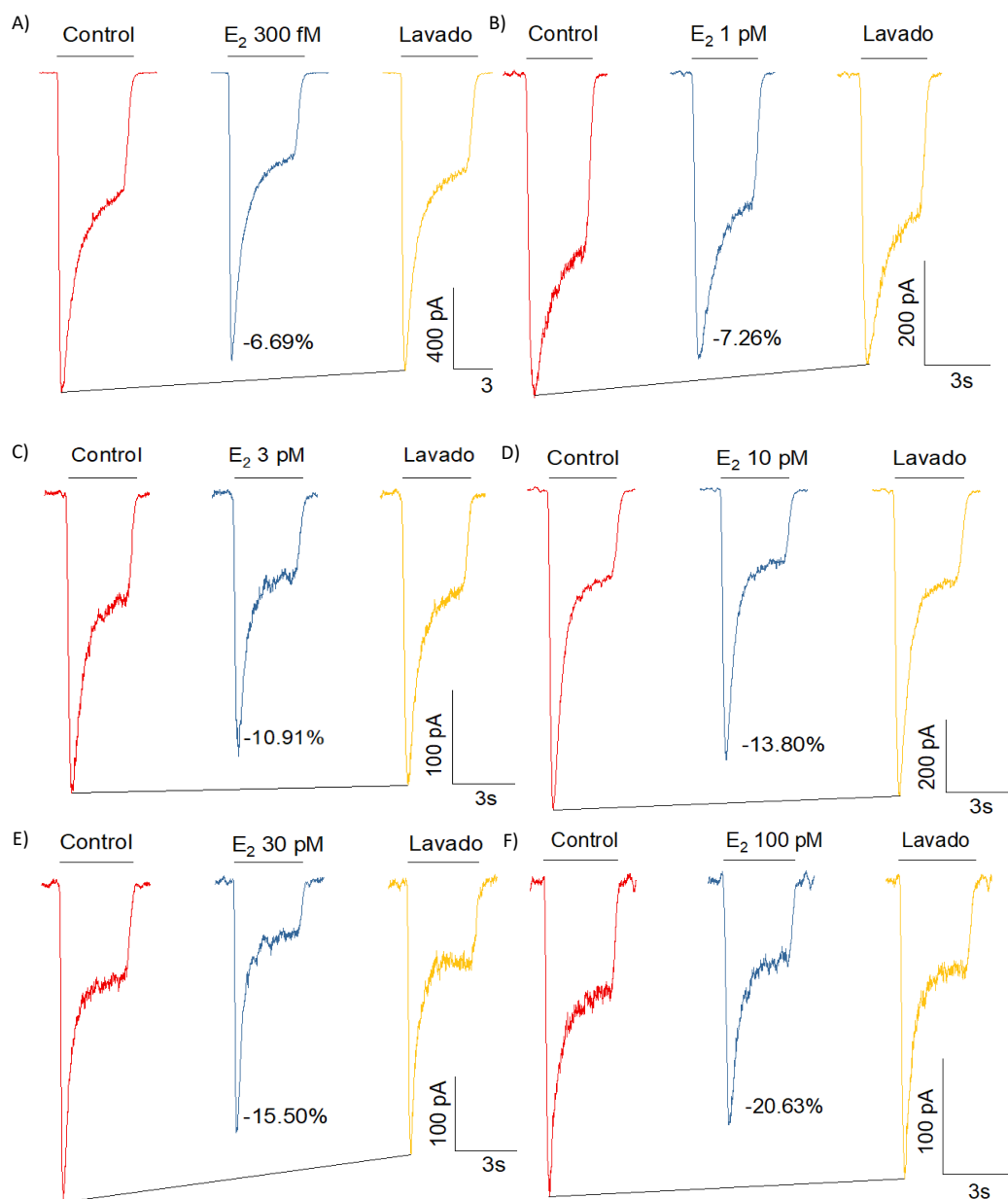
Se aplicaron un total de 8 concentraciones de E<sub>2</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM) sobre la INMDA en 20 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones de E<sub>2</sub> y todas en este grupo experimental indujeron una reducción de la INMDA, los valores se resumen en la tabla 5

Concentración (pM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
<b>0.1</b>	3.88	1,37	5
<b>0.3</b>	7.62	0.82	5
<b>1</b>	8.95	1.88	9
<b>3</b>	9.72	2.12	9
<b>10</b>	13.03	2.30	7
<b>30</b>	14.81	2.30	7
<b>100</b>	20.99	2.85	7
<b>300</b>	22.83	4.54	6



Gráfica 9. Trazos representativos del efecto máximo y mínimo de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en la región AcbS. A. Efecto de la concentración mínima empleada para este estudio, 100 fM, en esta célula redujo un 4.13% la INMDA. B. Efecto de la concentración máxima en este estudio, 300 pM, en esta célula redujo un 23.82% la INMDA. El efecto fue parcialmente lavable.

Los trazos representativos de las todas las concentraciones empleadas para la región AcbS, se muestran en las gráficas 9 y 10, en donde se observó que estos efectos fueron parcialmente lavados y dependientes de la dosis.



Gráfica 10. Trazos representativos del efecto de las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 pM de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en la región AcbS. En cada inciso se muestra el respectivo porcentaje de reducción obtenido en las diferentes neuronas espinosas medianas registradas. Los efectos fueron parcialmente lavables.

La media aritmética de los efectos de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de  $13.85 \pm 20.40$  pM, con un ajuste de R<sup>2</sup> de 0.85 (gráfica 5 ●).



## S1.2 Efecto del estradiol sobre la corriente activada por NMDA en neuronas espinosas medianas de ratas *sin* un pretratamiento con benzoato de estradiol

Para este grupo experimental, se realizaron las pruebas sin la administración subcutánea de BE<sub>2</sub>. Los resultados encontrados muestran que, algunas de las concentraciones incrementaron la INMDA, mientras que otras la redujeron (Gráfica 11).

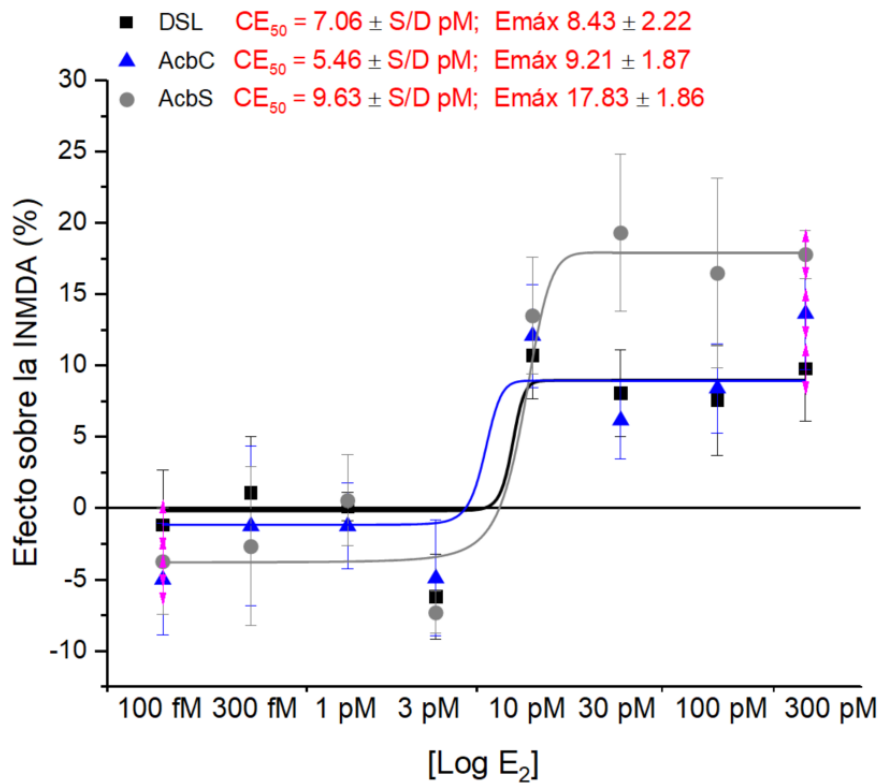
### S1.2.1 Dorsolateral (DSL)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones de E<sub>2</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM) sobre la INMDA en 10 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Los valores se resumen en la tabla 6, los números en negativo indican un porcentaje de aumento de la corriente.

<b>Tabla 6. Promedio del efecto de cada concentración de E<sub>2</sub> en el estriado DSL (sin pretratamiento con BE<sub>2</sub>)</b>			
<b>Concentración (pM)</b>	<b>% Reducción</b>		<b>n</b>
	<b>Media</b>	<b>± EE</b>	
<b>0.1</b>	-1.21	3.85	5
<b>0.3</b>	1.06	3.93	4
<b>1</b>	0.07	0.98	4
<b>3</b>	-6.23	2.99	4
<b>10</b>	10.69	3.01	10
<b>30</b>	8.06	3.05	9
<b>100</b>	7.56	3.86	8
<b>300</b>	9.76	3.64	6

**\*Los valores negativos indican una potenciación en la INMDA**

La media aritmética del efecto de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de 7.06 pM, el análisis no mostró datos sobre el error estándar de la media, y tuvo un ajuste de R<sup>2</sup> de 0.83 (gráfica 11 ■).



Gráfica 11. Curvas Dosis-Respuesta del efecto de  $E_2$  sobre la INMDA en las tres áreas de estudio sin un pretratamiento con  $BE_2$ . De cada concentración se graficó la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) en escala logarítmica. Se aprecia que, numéricamente el mayor y menor efecto del  $E_2$  sobre la INMDA corresponde a la región AcbS a una concentración de 30 y 3 pM respectivamente, y en esta última observamos una potenciación.

### S1.2.2 Núcleo Accumbens Core (AcbC)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones de  $E_2$  (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM) sobre la INMDA en 11 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Los valores se resumen en la tabla 7, los números en negativo indican un porcentaje de aumento de la corriente.

<b>Concentración (pM)</b>	<b>% Reducción</b>		<b>n</b>
	<b>Media</b>	<b>± EE</b>	
<b>0.1</b>	-5.02	3.91	6
<b>0.3</b>	-1.26	5.59	4
<b>1</b>	-1.26	3.04	6
<b>3</b>	-4.93	4.06	6
<b>10</b>	12.07	3.62	10
<b>30</b>	6.12	2.70	10
<b>100</b>	8.39	3.14	11
<b>300</b>	13.62	3.9	6

**\*Los valores negativos indican una potenciación en la INMDA**

La media aritmética del efecto de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de 5.46 pM, el análisis no mostró datos sobre el error estándar de la media, y tuvo un ajuste de R<sup>2</sup> de 0.81 (gráfica 11 ▲).

### **S1.2.3 Núcleo Accumbens *Shell* (AcbS)**

Se aplicaron un total de 8 concentraciones de E<sub>2</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 pM) sobre la INMDA en 11 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones.

<b>Concentración (pM)</b>	<b>% Reducción</b>		<b>n</b>
	<b>Media</b>	<b>± EE</b>	
<b>0.1</b>	-3.75	3.73	3
<b>0.3</b>	-2.7	5.56	3
<b>1</b>	0.53	3.20	3
<b>3</b>	-7.33	1.46	3
<b>10</b>	13.48	4.08	10
<b>30</b>	19.29	5.53	9
<b>100</b>	16.46	6.64	8
<b>300</b>	17.78	1.68	6

**\*Los valores negativos indican una potenciación en la INMDA**

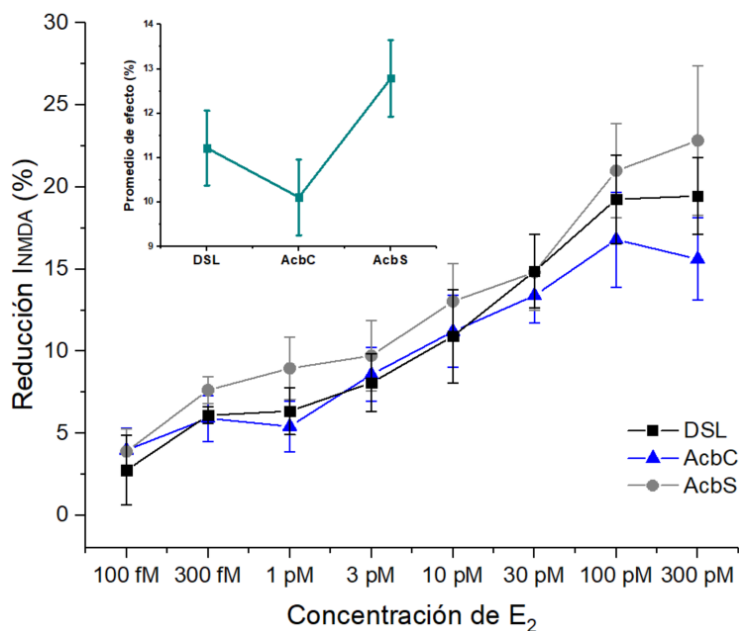
La media aritmética del efecto de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de 9.63 pM, el análisis no mostró datos sobre el error estándar de la media, y tuvo un ajuste de R<sup>2</sup> de 0.93 (gráfica 11 ●).

### S1.3 Efecto del pretratamiento con BE<sub>2</sub> y la subregión estriatal sobre la INMDA

#### S1.3.1 E<sub>2</sub> + pretratamiento con BE<sub>2</sub>

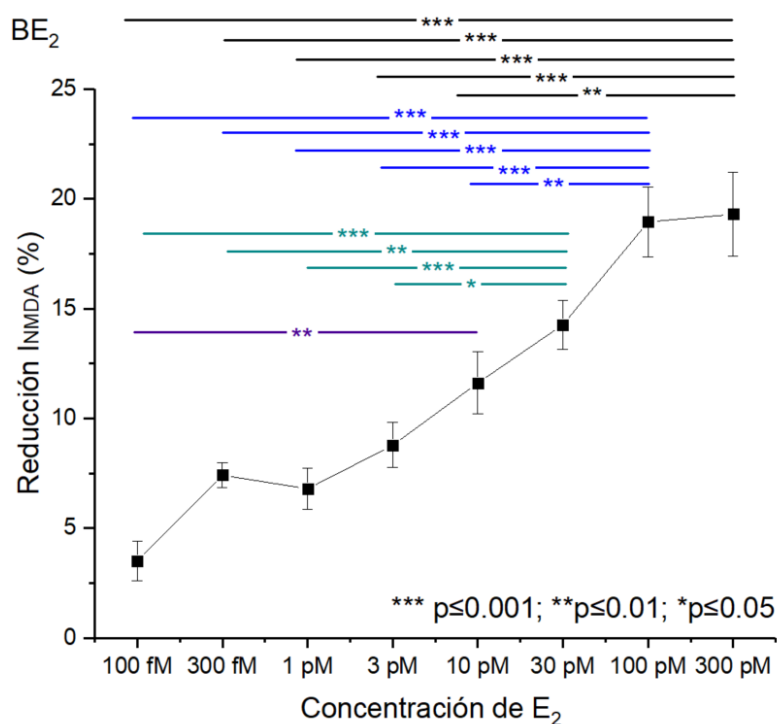
Para evaluar el efecto de la subregión estriatal y la concentración sobre el efecto de la INMDA, se aplicó una prueba de ANOVA de dos vías. Los resultados nos muestran que la región cerebral de estudio (DSL, AcbC y AcbS) no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la corriente activada por NMDA  $F_{(2,154)} = 2.46, p = 0.089, \eta^2p = 0.031$  (gráfica 12); ni la interacción concentración\*región  $F_{(14,154)} = 0.258, p = 0.997, \eta^2p = 0.023$ .

Se encontró que la interacción fue significativa en las concentraciones aplicadas sobre la INMDA  $F_{(7,154)} = 16.915, p = 0.0001; \eta^2p = 0.435$ , con un tamaño de efecto grande, esto nos indica que la respuesta al E<sub>2</sub> depende de la concentración de la hormonal probada en nuestras condiciones experimentales. A pesar de que el promedio de los efectos ejercidos por el rango de concentraciones aplicadas, muestra que la región AcbC tiene una respuesta más baja que AcbS, la prueba estadística no apoya una diferencia significativa entre las regiones (Inserto, gráfica 12).



Gráfica 12. Efecto de la concentración de E<sub>2</sub> y las tres subregiones del estriado sobre la corriente activada por NMDA. Se graficó el promedio ± EEM. del efecto de las concentraciones 100fM-300pM. El efecto fue de reducción sobre la INMDA de una forma dependiente de la dosis. El análisis estadístico muestra que no hay diferencia significativa entre el efecto de las regiones de estudio. En el inserto se muestra el efecto de la región sobre la INMDA (promedio de los efectos), numéricamente la región AcbC tiene un efecto menor y que en AcbS la respuesta ejercida es mayor. No se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Debido a que la respuesta a diferentes concentraciones de E<sub>2</sub> no difirió significativamente entre las tres regiones cerebrales (interacción concentración\*región ( $p=0.997$ )), los datos de cada concentración fueron considerados en conjunto y se construyó la gráfica 13, y al haberse encontrado un efecto principal significativo en la concentración, se compararon entre pares a través de una prueba *post hoc* de Tukey, con la que se establecieron las diferencias entre cada uno de los niveles, mostrando que el efecto de reducción del E<sub>2</sub> sobre la INMDA incrementó a lo largo del rango de las concentraciones. Adicionalmente, a estos datos se les aplicó una prueba T de una muestra, los datos indican que los efectos de todas las concentraciones sobre la INMDA fueron significativamente diferentes de 0 (0 = ausencia de respuesta). Los datos estadísticos se resumen en la tabla 9.



Gráfica 13. Efecto de la concentración de E<sub>2</sub> sobre la INMDA en las MSN's de ratas pretratadas con BE<sub>2</sub>. Se graficó el promedio ± EEM. Se muestra que todas las concentraciones probadas, reducen la corriente de una forma dependiente de la dosis. El análisis estadístico muestra que hay diferencia significativa entre la mayoría de las concentraciones. Para mayor detalle del análisis, ver tabla 9.

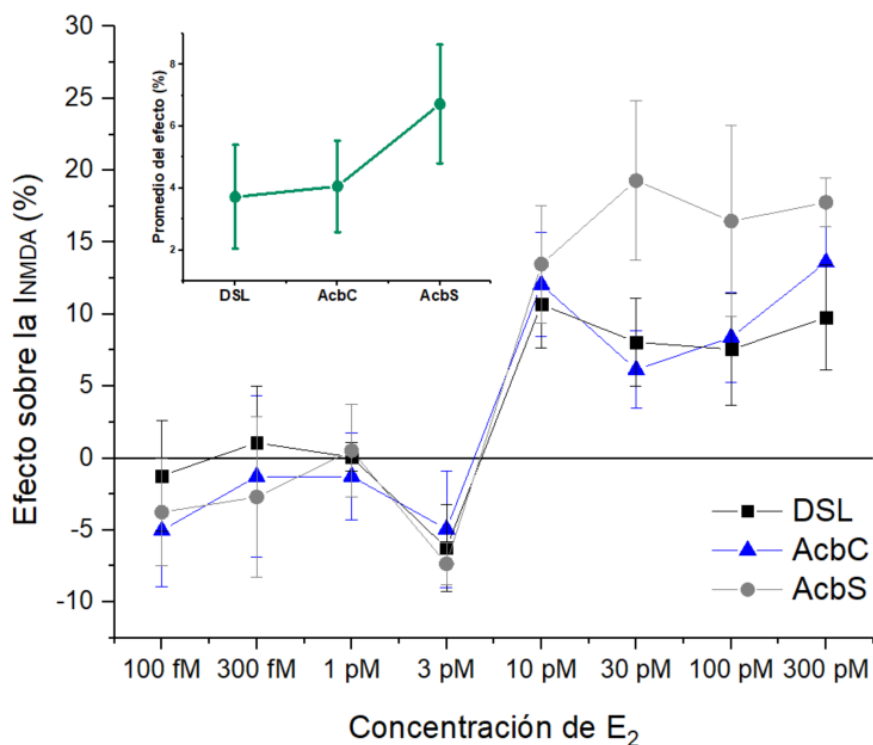
**Tabla 9. Resumen de los resultados de las pruebas de Tukey y T de Student de una muestra**

Concentración E <sub>2</sub>	10 pM	30 pM	100 pM	300 pM	T de una muestra
0.1 pM (n= 14)	0.004	0.0001	0.0001	0.0001	0.002
0.3 pM (n= 13)		0.034	0.0001	0.0001	0.0001
1 pM (n= 30)		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3 pM (n= 29)		0.033	0.0001	0.0001	0.0001
10 pM (n= 24)			0.002	0.003	0.0001
30 pM (n=25)					0.0001
100 pM (n=25)					0.0001
300 pM (n=18)					0.0001

\*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$

### S1.3.2 E<sub>2</sub> sin pretratamiento con BE<sub>2</sub>

Los datos obtenidos del análisis estadístico ANOVA de dos vías, nos muestran que la región cerebral de estudio (DSL, AcbC y AcbS) no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la corriente activada por NMDA  $F_{(2,129)} = 0.813$ ,  $p = 0.446$ ,  $\eta^2 p = 0.012$  (Ver gráfica 14), ni tampoco en la interacción concentración\*región  $F_{(14,129)} = 0.545$ ,  $p = 0.902$ ,  $\eta^2 p = 0.056$ . Se encontró un efecto principal significativo en las concentraciones aplicadas sobre la INMDA  $F_{(7,129)} = 8.15$ ,  $p = 0.0001$ ;  $\eta^2 p = 0.307$ , con un tamaño de efecto grande, esto nos indica que la respuesta observada al aplicar E<sub>2</sub> depende de la concentración hormonal. A pesar de que el promedio de los efectos ejercidos por el rango de concentraciones muestra que la región AcbS tiene una respuesta mayor al E<sub>2</sub>, la prueba estadística no apoya una diferencia significativa entre las regiones (Inserto, gráfica 14)

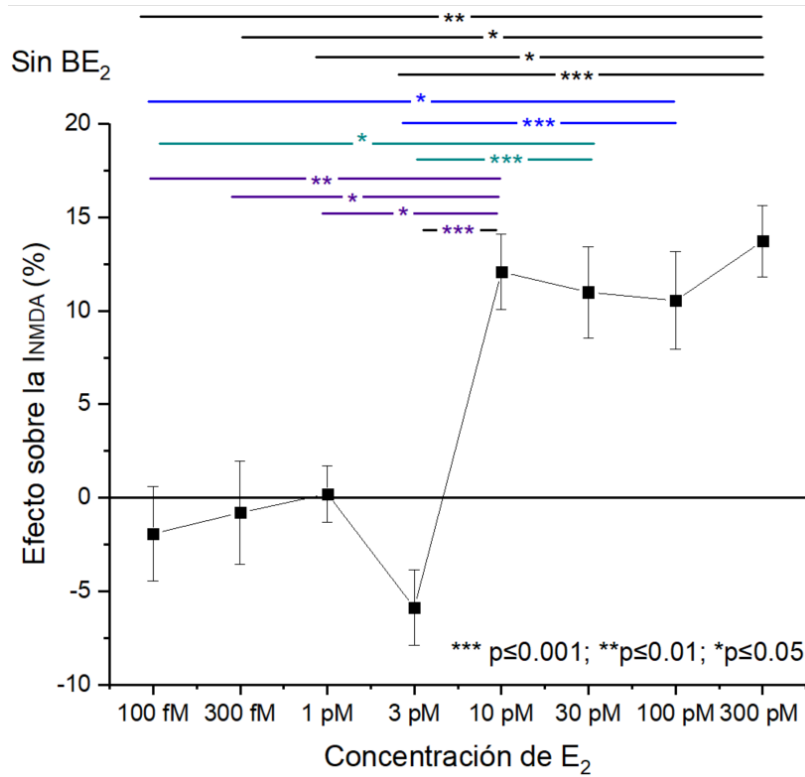


Gráfica 14. Efecto de la concentración de E<sub>2</sub> y las tres subregiones sobre la INMDA. Se graficó el promedio  $\pm$  EEM. Se muestra que las concentraciones 0.1-3 pM aumentan la INMDA, sin embargo, solo la dosis 3 pM es estadísticamente diferente de 0, mientras que las demás concentraciones tienen un efecto de reducción sobre la corriente. El análisis estadístico muestra que no hay diferencia significativa entre las regiones de estudio. En el inserto se muestra el efecto de la región sobre la INMDA, se observa que numéricamente la región AcbS tiene un efecto mayor comparado con las áreas DSL y AcbC, pero tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Debido a que la respuesta a diferentes concentraciones de E<sub>2</sub> no difirió significativamente entre las tres regiones cerebrales (interacción concentración\*región ( $p=0.902$ )), los datos de cada concentración fueron considerados en conjunto y se construyó la gráfica 15.

Al haber encontrado un efecto principal significativo en la concentración, se compararon entre pares de concentraciones a través de una prueba *post hoc* de Tukey, con la que se establecieron las diferencias entre cada uno de los niveles. Adicionalmente, a estos datos se les aplicó una prueba T de una muestra, indicando que las concentraciones 0.1, 0.3 y 1 pM no son estadísticamente diferentes de 0, indicando la ausencia de una respuesta biológica significativa en estas dosis (0.1 pM  $t_{(12)} = -0.766$ ,  $p = 0.457$ ; 0.3 pM  $t_{(8)} = -0.293$ ,  $p = 0.777$ ; 1pM  $t_{(12)} = 0.137$ ,

$p= 0.893$ ); Por otro lado, la concentración de 3 pM potenció significativamente la INMDA  $t_{(12)}=-2.933$ ,  $p= 0.013$ , mientras las concentraciones más elevadas, redujeron la INMDA. Los datos estadísticos se resumen en la tabla 10.



Gráfica 15. Efecto del E<sub>2</sub> sobre la INMDA en las MSN's de ratas sin un pretratamiento con BE<sub>2</sub>. Se graficó el promedio ± EEM. Se muestra que las concentraciones probadas de 0.1-1 pM no tienen un efecto estadísticamente significativo diferente a 0 o inclusive la concentración 3pM potencia la INMDA. El análisis estadístico muestra que hay diferencia significativa entre las concentraciones. Para mayor detalle del análisis, ver tabla 10.



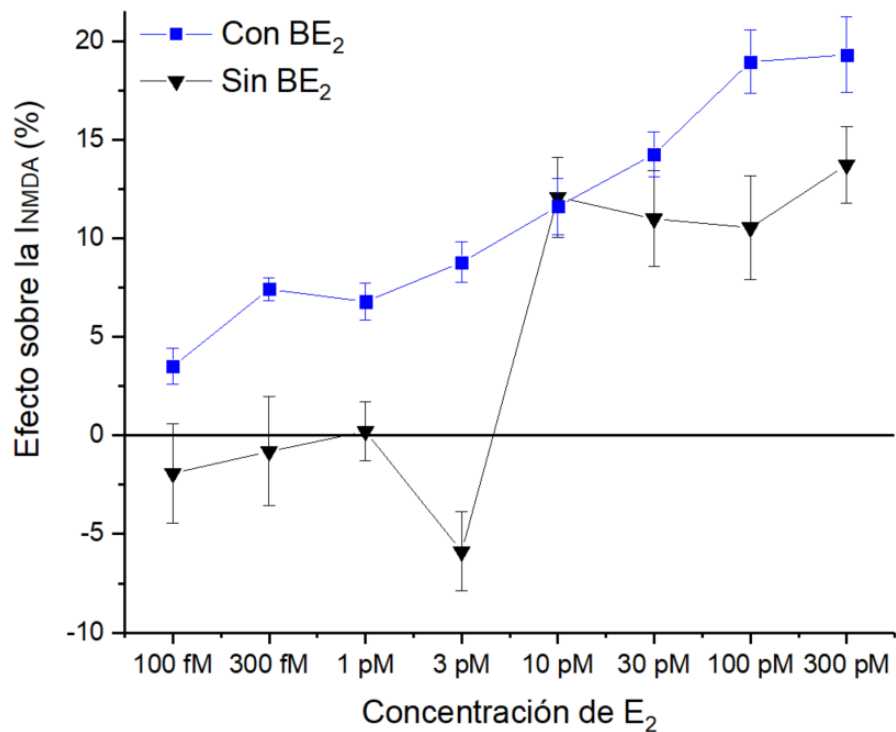
**Tabla 10. Resumen de los resultados de las pruebas de Tukey y T de Student de una muestra**

<i>Concentración E<sub>2</sub></i>	<b>10 pM</b>	<b>30 pM</b>	<b>100 pM</b>	<b>300 pM</b>	<b>T de una muestra</b>
<i>0.1 pM (n=15)</i>	0.002	0.007	0.012	0.002	0.457
<i>0.3 pM (n=10)</i>	0.044			0.028	0.777
<i>1 pM (n=13)</i>	0.027			0.018	0.893
<i>3 pM (n=13)</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.013
<i>10 pM (n=30)</i>					0.0001
<i>30 pM (n=28)</i>					0.0001
<i>100 pM (n=27)</i>					0.0001
<i>300 pM (n=18)</i>					0.0001

\*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$

Derivado de los datos anteriores, se graficaron los efectos de la concentración sobre la INMDA (Gráfica 16) con y sin un pretratamiento con el BE<sub>2</sub>. Podemos observar que la concentración mínima probada de 100 fM, cuando el animal es pretratado con BE<sub>2</sub> tiene una respuesta significativamente diferente de 0 ( $p=0.002$ ), esto no ocurre cuando no hay un pretratamiento, donde la primera respuesta significativa la encontramos en 3 pM ( $p=0.013$ ).

A pesar de que el efecto principal de la concentración para ambos tratamientos resultó estadísticamente significativo ( $p=0.0001$ ) la diferencia entre el tamaño del efecto (Con BE<sub>2</sub>  $\eta^2_p = 0.435$  y Sin BE<sub>2</sub>  $\eta^2_p = 0.307$ ) sugiere que el pretratamiento no afectó en gran medida la respuesta al E<sub>2</sub> ( $0.435/0.307=1.41$ ).



Gráfica 16. Efecto del E<sub>2</sub> sobre la INMDA en las MSN's de ratas con y sin un pretratamiento con BE<sub>2</sub>. Se graficó el promedio  $\pm$  EEM. Se muestra que, a pesar de que el análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre las concentraciones, la magnitud de la diferencia entre ambos tratamientos es pequeña, sugiriendo que al aumentar las concentraciones fisiológicas de E<sub>2</sub>, eventualmente puedan tener el mismo efecto.

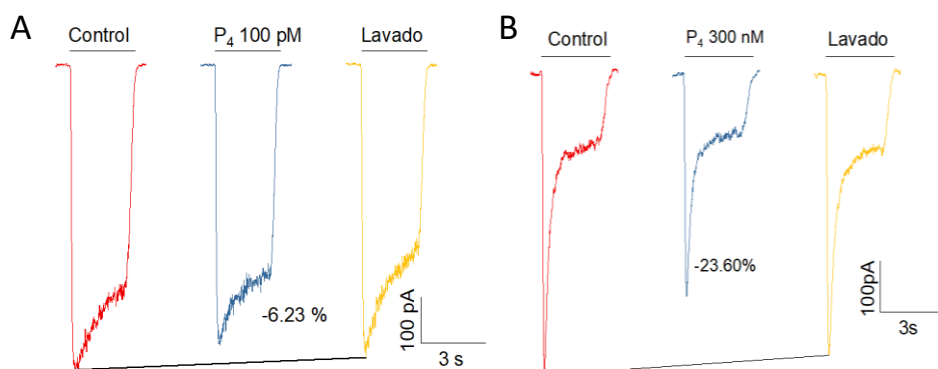
## SECCIÓN 2. Progesterona (P<sub>4</sub>)

### S2.1 Efecto de la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas espinosas medianas de ratas con un pretratamiento *con* benzoato de estradiol

#### S2.1.1 Dorsolateral (DSL)

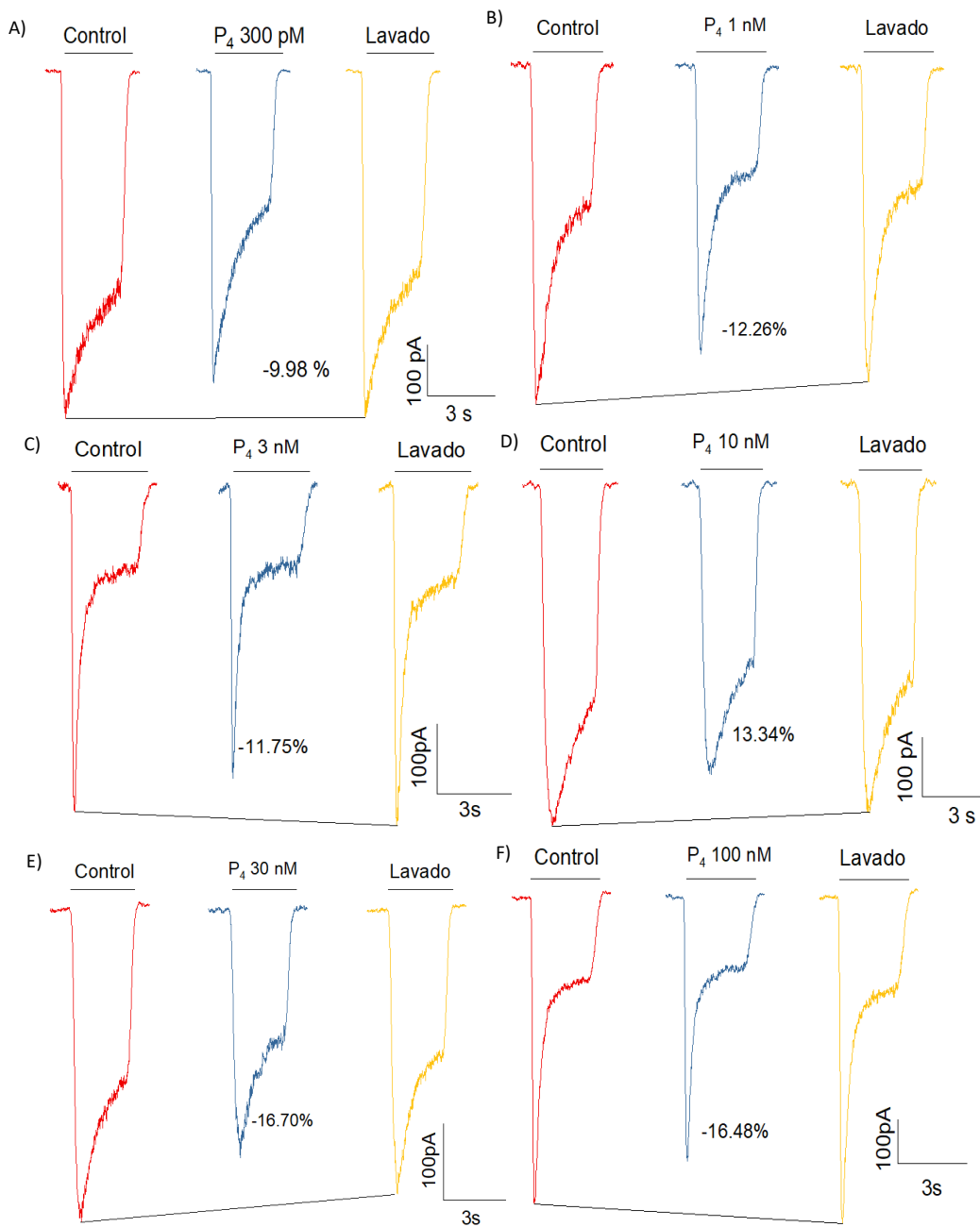
Se aplicaron un total de 8 concentraciones P<sub>4</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM) sobre la INMDA en 18 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Todas las concentraciones probadas de P<sub>4</sub> para este grupo experimental indujeron una reducción de la INMDA, los valores se resumen en la tabla 11

<b>Tabla 11. Promedio del efecto de cada concentración de P<sub>4</sub> en el estriado DSL (pretratamiento con BE<sub>2</sub>)</b>			
<b>Concentración (nM)</b>	<b>% Reducción</b>		<b>n</b>
	<b>Media</b>	<b>± EE</b>	
<b>0.1</b>	5.44	1.04	4
<b>0.3</b>	10.8	1.22	4
<b>1</b>	10.75	1.91	5
<b>3</b>	11.99	3.09	6
<b>10</b>	12.08	0.94	6
<b>30</b>	14.45	1.79	6
<b>100</b>	18.93	1.18	7
<b>300</b>	22.32	2.10	6



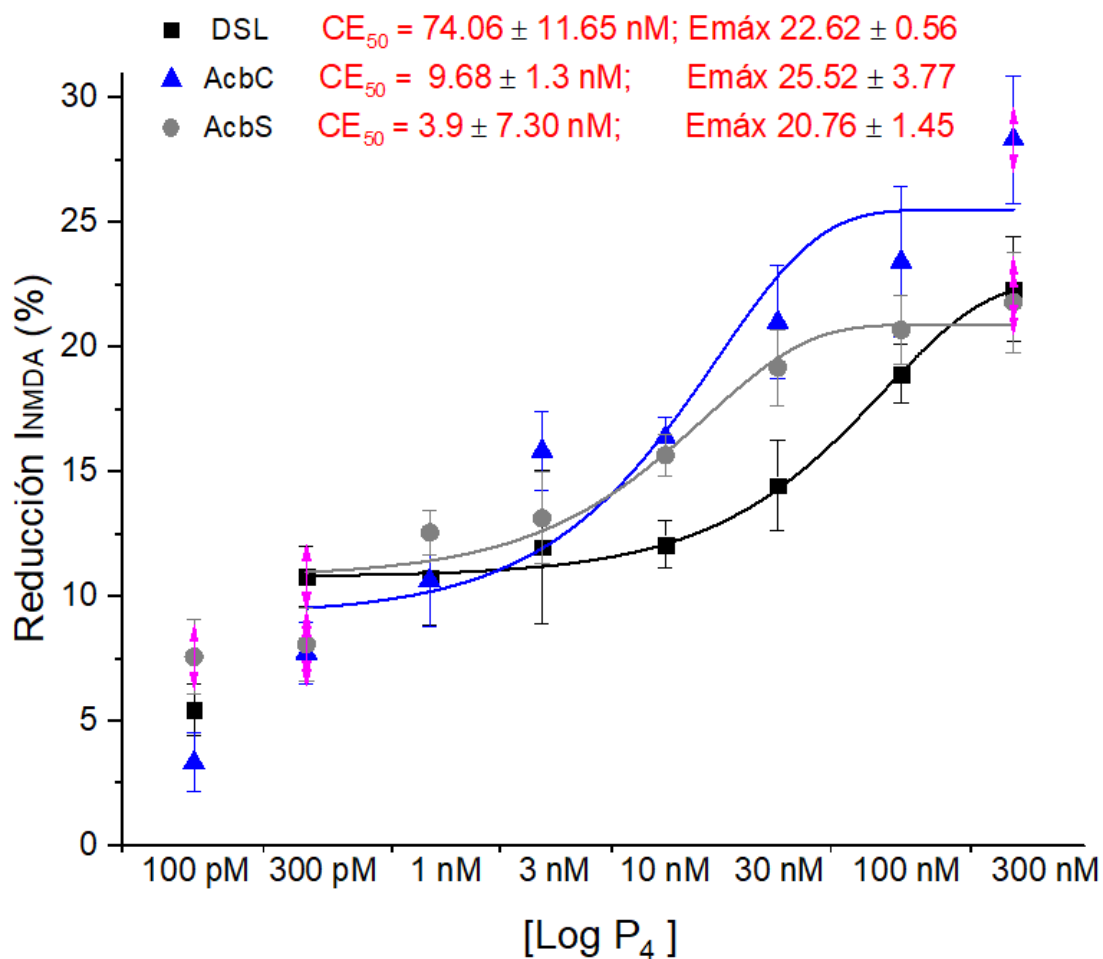
Gráfica 17. Trazos representativos del efecto máximo y mínimo de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en la región DSL. A. Efecto mínimo en la concentración de 100 pM, en esta célula redujo un 6.23% la INMDA. B. Efecto máximo en la concentración de 300 pM, en esta célula redujo un 23.6% la INMDA. El efecto es parcialmente lavable.

Los trazos representativos de todas las concentraciones de P<sub>4</sub> empleadas en la región DSL, se muestran en las gráficas 17 y 18, en donde se observa que estos efectos fueron parcialmente lavados y dependientes de la dosis.



Gráfica 18. Trazos representativos del efecto de las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 nM de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en la región dorsolateral. En cada inciso se muestra el respectivo porcentaje de reducción obtenido en las diferentes neuronas espinosas medianas registradas. Los efectos son parcialmente lavables.

Estos datos se ajustaron a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) de  $74.06 \pm 11.65$  nM, con un ajuste de  $R^2$  de 0.99 (gráfica 19 ■).



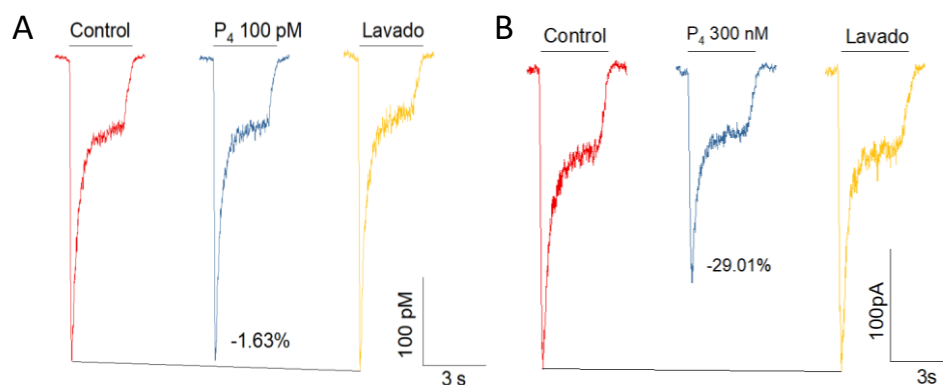
Gráfica 19. Curvas Dosis-Respuesta del efecto de la concentración de  $P_4$  sobre la INMDA en las tres áreas de estudio. De cada concentración se graficó la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) en escala logarítmica. Se aprecia que, numéricamente el mayor y menor efecto de la  $P_4$  sobre la INMDA se encuentra en la región AcbC a una concentración de 300 nM ( $Emáx = 25.52 \pm 3.77$ ) y 100 pM respectivamente.

### S2.1.2 Núcleo Accumbens Core (AcbC)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones  $P_4$  (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM) sobre la INMDA en 17 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Todas las concentraciones probadas de  $P_4$  para este grupo experimental indujeron una reducción de la INMDA, los valores se resumen en la tabla 12

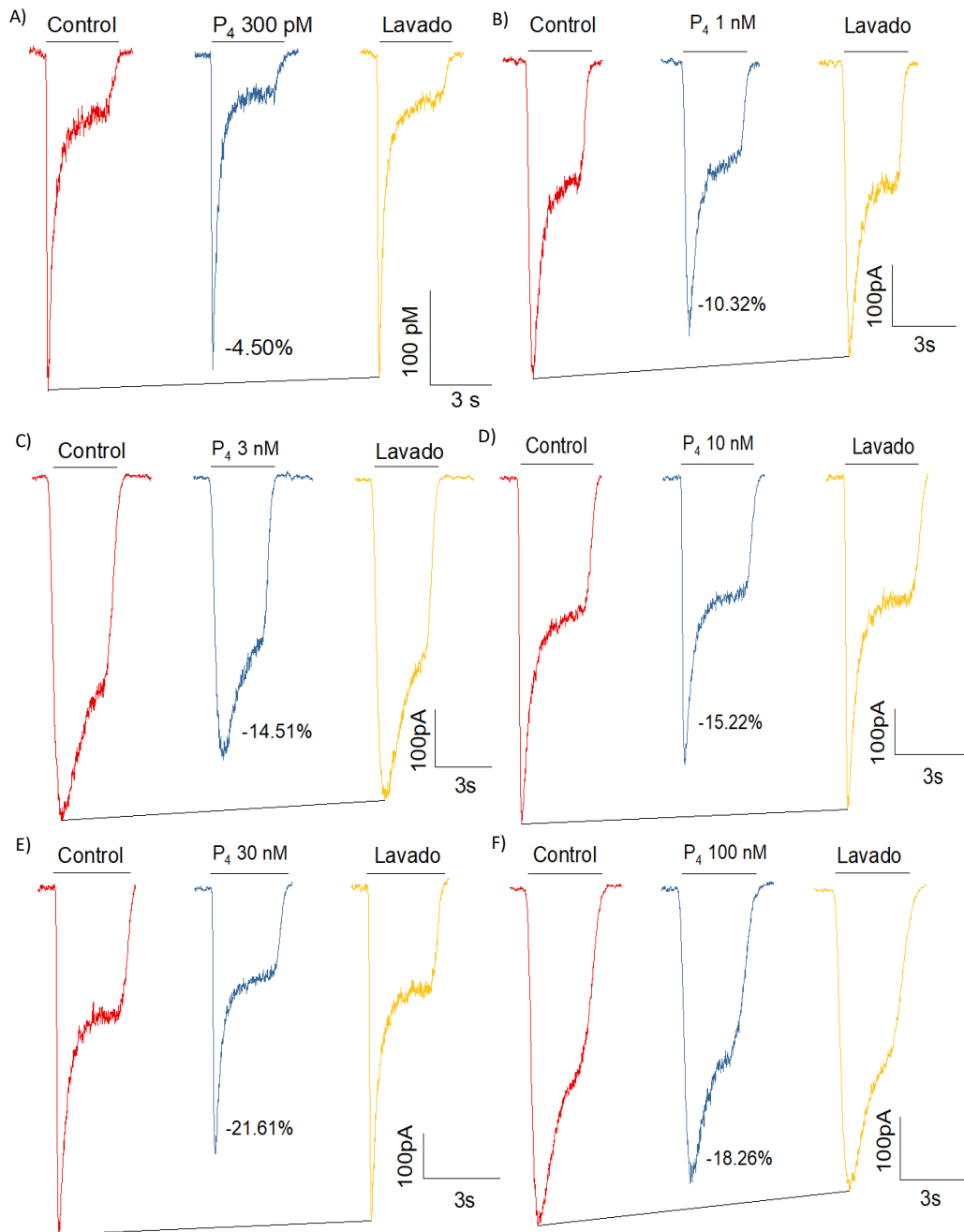
Tabla 12. Promedio del efecto de cada concentración de P <sub>4</sub> en el AcbC (pretratamiento con BE <sub>2</sub> )				
Concentración (nM)	% Reducción			n
	Media	±	EE	
0.1	3.33		1.17	5
0.3	7.72		1.22	5
1	10.65		1.87	6
3	15.83		1.58	6
10	16.38		0.82	5
30	21		2.28	6
100	23.43		3.02	5
300	28.33		2.55	4

El efecto máximo se observó en la concentración 300 nM y el efecto mínimo en la concentración de 100 pM (ver gráfica 20).



Gráfica 20. Trazos representativos del efecto máximo y mínimo de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en la región AcbC. A. Efecto mínimo en la concentración de 1 pM, en esta célula redujo un 1.63% la INMDA. B. Efecto máximo en la concentración de 300 pM, en esta célula redujo un 29.01% la INMDA. El efecto es parcialmente lavable.

Los trazos representativos de todas las concentraciones empleadas en la región AcbC, se muestran en las gráficas 20 y 21, en donde se observa que estos efectos fueron parcialmente lavados y dependientes de la dosis.



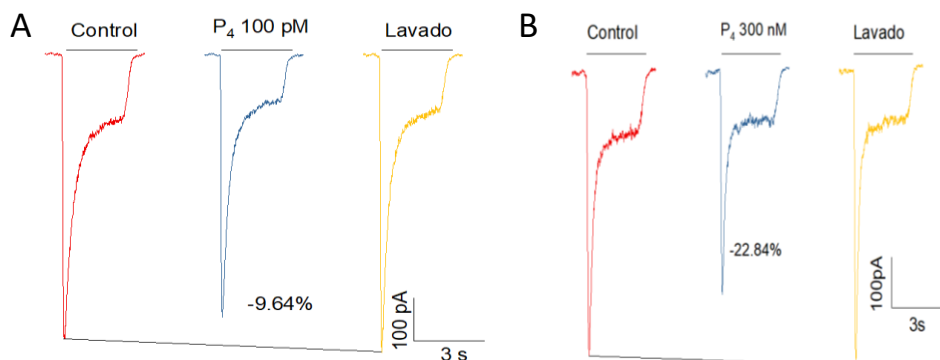
Gráfica 21. Trazos representativos del efecto de las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 nM de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en la región AcbC. En cada inciso se muestra el respectivo porcentaje de reducción obtenido en las diferentes neuronas espinosas medianas registradas. Los efectos son parcialmente lavables.

La media aritmética de los efectos de cada concentración se ajustó a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de  $9.68 \pm 1.3$  pM, con un ajuste de R<sup>2</sup> de 0.87 (gráfica 19 ▲).

### S2.1.3 Núcleo Accumbens *Shell* (AcbS)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones P<sub>4</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM) sobre la INMDA en 21 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Todas las concentraciones probadas de P<sub>4</sub> para este grupo experimental indujeron una reducción de la INMDA, los valores se resumen en la tabla 13

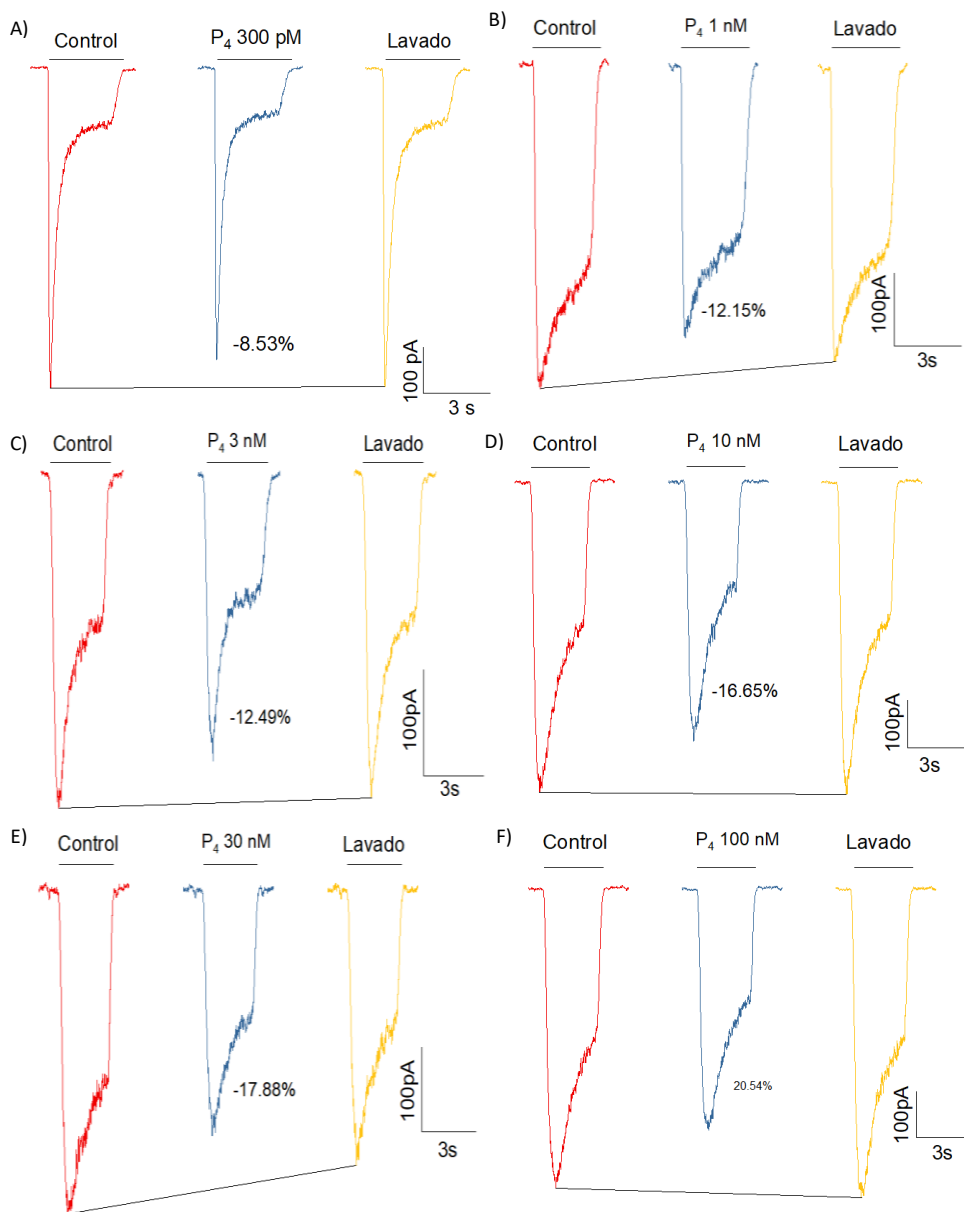
Tabla 13. Promedio del efecto de cada concentración de P <sub>4</sub> en el estriado AcbS (pretratamiento con BE <sub>2</sub> )			
Concentración (nM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
0.1	7.58	1.48	6
0.3	8.93	1.38	6
1	12.07	0.88	6
3	13.14	1.84	8
10	15.66	0.81	9
30	19.19	1.53	8
100	20.68	1.39	7
300	21.80	2.03	7



Gráfica 22. Trazos representativos del efecto máximo y mínimo de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en la región AcbS. A. Efecto mínimo en la concentración de 100 pM, en esta célula redujo un 9.64% la INMDA. B. Efecto máximo en la concentración de 300 pM, en esta célula redujo un 22.84% la INMDA. El efecto fue parcialmente lavable.



Los trazos representativos de las todas las concentraciones empleadas para la región AcbS, se muestran en las gráficas 22 y 23, en donde se observa que estos efectos fueron parcialmente lavados y dependientes de la dosis.



Gráfica 24. Trazos representativos del efecto de las concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 nM de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en la región AcbS. En cada inciso se muestra el respectivo porcentaje de reducción obtenido en las diferentes neuronas espinosas medianas registradas. Los efectos son parcialmente lavables.

Estos datos se ajustaron a una curva (ecuación) sigmoideal tipo dosis-respuesta, encontrándose una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de  $3.9 \pm 7.3$  nM, con un ajuste de R<sup>2</sup> de 0.92 (gráfica 19 ●).

## S2.2 Efecto de la progesterona sobre la corriente activada por NMDA en neuronas espinosas medianas de ratas *sin* un pretratamiento con benzoato de estradiol

Para este grupo experimental, se realizaron las pruebas sin la administración subcutánea de BE<sub>2</sub>. Los resultados encontrados muestran que, algunas de las concentraciones incrementaron la INMDA, mientras que otras la redujeron (Gráfica 25).

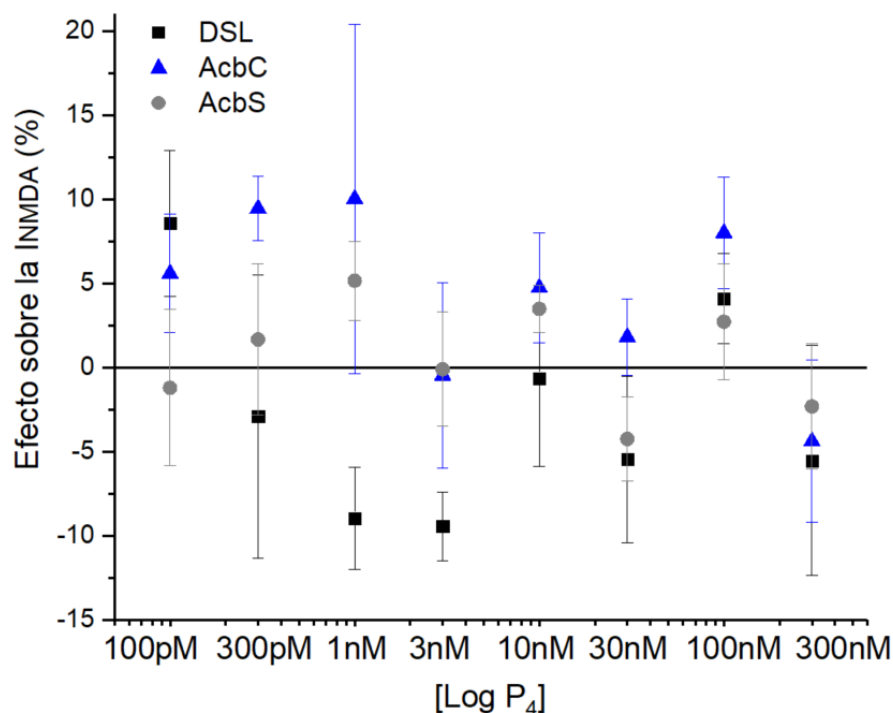
### S2.2.1 Dorsolateral (DSL)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones P<sub>4</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM) sobre la INMDA en 10 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Los valores se resumen en la tabla 14, los números en negativo indican un porcentaje de aumento de la corriente.

Concentración (nM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
<b>0.1</b>	8.56	4.32	4
<b>0.3</b>	-2.91	8.43	3
<b>1</b>	-8.94	3.02	3
<b>3</b>	-9.44	2.03	3
<b>10</b>	-0.65	5.20	7
<b>30</b>	-5.44	4.93	8
<b>100</b>	4.10	2.66	8
<b>300</b>	-5.53	6.84	4

**\*Los valores negativos indican una potenciación en la INMDA**

La media aritmética del efecto de cada concentración se utilizó para construir la gráfica 25 para evaluar si la respuesta correspondía a una tipo dosis-respuesta, el ajuste no mostró datos sobre la  $CE_{50}$  o el EEM (gráfica 25 ■).



Gráfica 25. Curvas Dosis-Respuesta del efecto de la  $P_4$  sobre la INMDA en las tres áreas de estudio sin un pretratamiento con  $BE_2$ . De cada concentración se graficó la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) en escala logarítmica. Se muestra claramente que el efecto de la  $P_4$  bajo estas condiciones experimentales, no sigue una dosis dependencia.

### S2.2.2 Núcleo Accumbens Core (AcbC)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones  $P_4$  (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM) sobre la INMDA en 9 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Los valores se resumen en la tabla 15, los números en negativo indican un porcentaje de aumento de la corriente.

**Tabla 15. Promedio del efecto de cada concentración de P<sub>4</sub> en el AcbC (sin pretratamiento con BE<sub>2</sub>)**

Concentración (nM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
0.1	5.58	3.51	4
0.3	9.45	1.91	4
1	10.01	10.37	3
3	-0.47	5.49	3
10	4.73	3.27	7
30	1.81	2.26	7
100	8	3.30	7
300	-4.37	4.8	5

**\*Los valores negativos indican una potenciación en la INMDA**

La media aritmética del efecto de cada concentración se utilizó para construir la gráfica 25 para evaluar si la respuesta correspondía a una tipo dosis-respuesta, el ajuste no mostró datos sobre la CE<sub>50</sub> o el EEM (gráfica 25 ▲).

### S2.2.3 Núcleo Accumbens *Shell* (AcbS)

Se aplicaron un total de 8 concentraciones P<sub>4</sub> (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 y 300 nM) sobre la INMDA en 11 neuronas. En cada neurona se administraron de dos a cuatro concentraciones. Los valores se resumen en la tabla 16, los números en negativo indican un porcentaje de aumento de la corriente.

**Tabla 16. Promedio del efecto de cada concentración de E<sub>2</sub> en el AcbS (sin pretratamiento con BE<sub>2</sub>)**

Concentración (nM)	% Reducción		n
	Media	± EE	
0.1	-1.20	4.63	5
0.3	1.66	4.48	6
1	5.15	2.36	5
3	-0.10	3.39	4
10	3.48	1.42	9
30	-4.24	2.47	9
100	2.72	3.44	8
300	-2.31	4.63	5

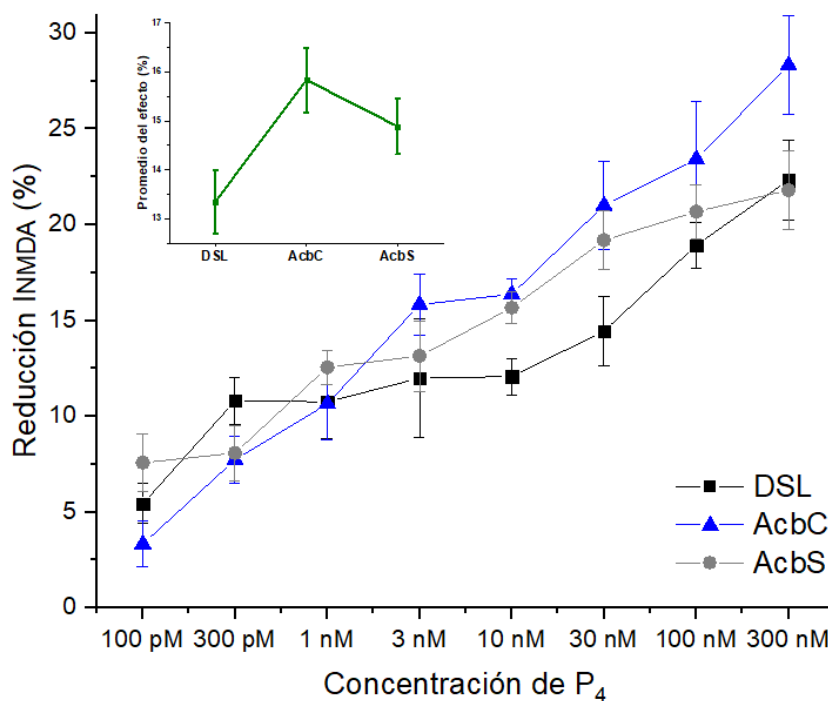
**\*Los valores negativos indican una potenciación en la INMDA**

La media aritmética del efecto de cada concentración se utilizó para construir la gráfica 25 para evaluar si la respuesta correspondía a una tipo dosis-respuesta, el ajuste no mostró datos sobre la CE<sub>50</sub> o el EEM (gráfica 25 ●).

## S2.3 Efecto del pretratamiento con BE<sub>2</sub> y la subregión estriatal sobre la INMDA

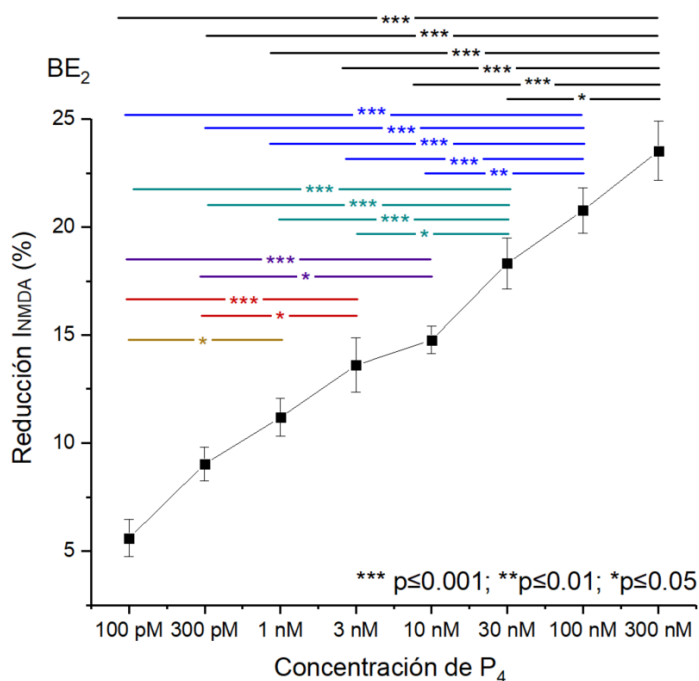
### S2.3.1 P<sub>4</sub> + pretratamiento con BE<sub>2</sub>

Para evaluar el efecto de la subregión estriatal y la concentración sobre el efecto de la INMDA, se aplicó una prueba de ANOVA de dos vías. Los resultados nos muestran que la región cerebral de estudio tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la corriente activada por NMDA  $F_{(2,119)} = 3.688$ ,  $p = 0.028$ ,  $\eta^2 p = 0.058$  con un tamaño de efecto pequeño (Ver gráfica 26), sugiriendo que la respuesta de esta hormona pudiera ser diferente entre las subregiones del estriado (DSL, AcbC y AcbS). Además se encontró un efecto principal en la concentración  $F_{(7,119)} = 34.322$ ,  $p = 0.0001$ ,  $\eta^2 p = 0.669$  con un tamaño de efecto grande, hecho que nos indica que la respuesta a la P<sub>4</sub> depende de la concentración de la hormonal probada en nuestras condiciones experimentales. No se encontró diferencia significativa en la interacción concentración\*región  $F_{(4,119)} = 1.388$ ,  $p = 0.169$ ,  $\eta^2 p = 0.140$ .



Gráfica 26. Efecto de la concentración de P<sub>4</sub> y las tres subregiones sobre la INMDA. Se graficó el promedio  $\pm$  EEM de todas las concentraciones probadas (100pM-300nM), cuyo efecto fue de reducción sobre la INMDA de una forma dependiente de la dosis. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa entre el efecto de las regiones de estudio. En el inserto se muestra el efecto de la región sobre la INMDA (promedio de los efectos), se observa que numéricamente la región AcbC tiene un efecto mayor que el AcbS y DSL.

Debido a que se encontró un efecto principal entre las regiones de estudio, para determinar entre que áreas existe una diferencia estadística, se realizó una *post hoc* de Tukey, sin embargo, con esta postprueba no se encontró diferencia significativa entre las regiones (Tabla 18). Puesto que en la prueba *post hoc* no se encontró diferencia significativa entre las tres regiones cerebrales y la respuesta a diferentes concentraciones de P<sub>4</sub> no difirió significativamente entre las tres regiones cerebrales (interacción concentración\*región ( $p=0.169$ )), los datos de cada concentración fueron considerados en conjunto y se construyó la gráfica 27, y al haber encontrado un efecto principal significativo en la concentración, se compararon entre pares de dosis a través de una prueba *post hoc* de Tukey, con la que se establecieron las diferencias entre cada uno de los niveles, mostrando que el efecto de reducción de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA incrementó a lo largo del rango de las concentraciones. Adicionalmente, a estos datos se les aplicó una prueba T de una muestra, los datos indican que todas las concentraciones son significativamente diferentes de 0 (0 = ausencia de respuesta). Los datos estadísticos se resumen en la tabla 17.



Gráfica 27. Efecto de la concentración de P<sub>4</sub> sobre la INMDA en las MSN's de ratas pretratadas con BE<sub>2</sub>. Se graficó el promedio  $\pm$  EEM. Se muestra que todas las concentraciones probadas, reducen la INMDA de una forma dependiente de la dosis. El análisis estadístico muestra que hay diferencia significativa entre la mayoría de las concentraciones. Para mayor detalle del análisis, ver tabla 17.

**Tabla 17. Resumen de los resultados de las pruebas de Tukey y T de Student de una muestra**

<i>Concentración P<sub>4</sub></i>	<b>1 nM</b>	<b>3 nM</b>	<b>10 nM</b>	<b>30 nM</b>	<b>100 nM</b>	<b>300 nM</b>	<b>T de una muestra</b>
<i>0.1 nM (n=15)</i>	0.007	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>0.3 nM (n=15)</i>		0.041	0.003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>1 nM (n=17)</i>				0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>3 nM (n=20)</i>				0.014	0.0001	0.0001	0.0001
<i>10 nM (n=20)</i>					0.001	0.0001	0.0001
<i>30 nM (n=20)</i>						0.007	0.0001
<i>100 nM (n=19)</i>							0.0001
<i>300 nM (n=17)</i>							0.0001

\*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$

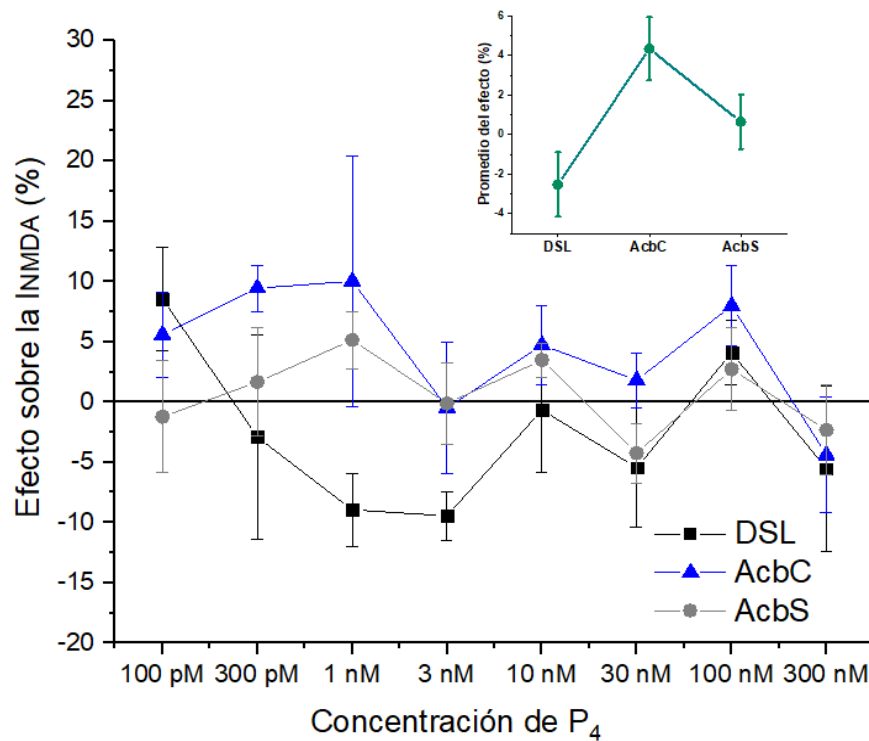
**Tabla 18. Prueba de Tukey entre regiones**

<i>Área</i>	DSL	AcbC	AcbS
<i>DSL</i>	<b>X</b>	0.220	0.321
<i>AcbC</i>	0.220	<b>X</b>	0.936
<i>AcbS</i>	0.321	0.936	<b>X</b>

\*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*  $p \leq 0.05$

### S2.3.2 P<sub>4</sub> sin pretratamiento con BE<sub>2</sub>

Los datos obtenidos del análisis estadístico ANOVA de dos vías, nos muestran que la región cerebral de estudio tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la corriente activada por NMDA  $F_{(2,107)} = 4.588$ ,  $p = 0.012$ ,  $\eta^2 p = 0.079$  con un tamaño de efecto pequeño (Ver gráfica 28), sugiriendo que la respuesta de esta hormona pudiera ser diferente entre las subregiones del estriado (DSL, AcbC y AcbS). Además se encontró un efecto principal en la concentración  $F_{(7,107)} = 2.308$ ,  $p = 0.031$ ,  $\eta^2 p = 0.131$  con un tamaño de efecto mediano, hecho que nos indica que la respuesta a la P<sub>4</sub> depende significativamente de la concentración de la hormona probada en nuestras condiciones experimentales. No se encontró diferencia significativa en la interacción concentración\*región  $F_{(14,107)} = 0.816$ ,  $p = 0.650$ ,  $\eta^2 p = 0.096$ .

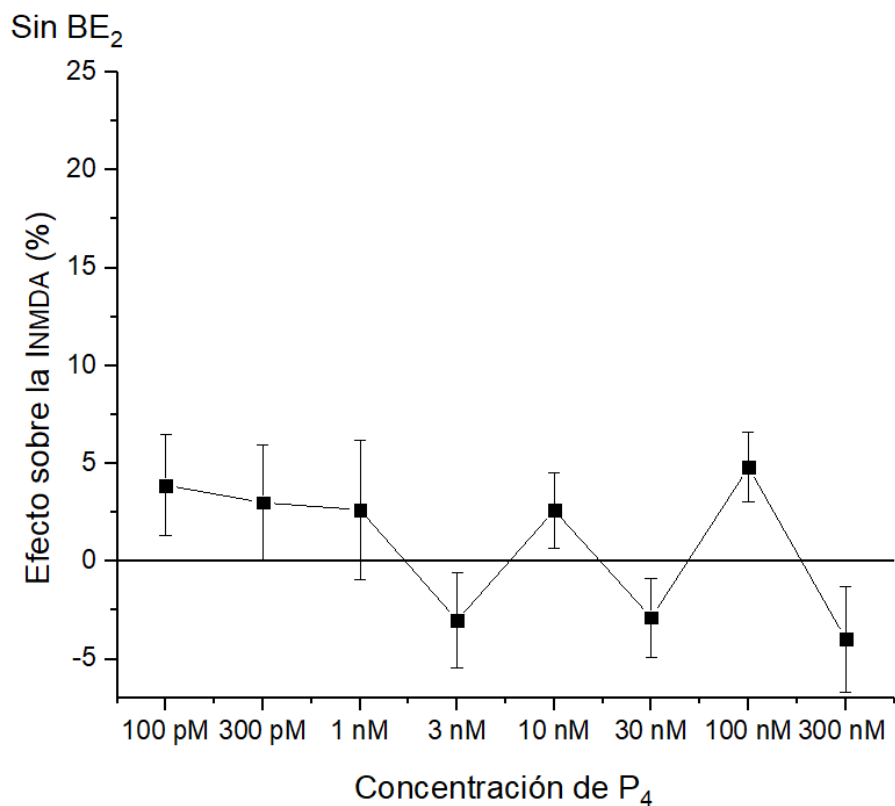


Gráfica 28. Efecto de la concentración de P<sub>4</sub> y las tres subregiones del estriado sobre la INMDA. Se graficó el promedio  $\pm$  EEM. Se muestra que las concentraciones probadas claramente no tienen un efecto dependiente de la dosis, ya que algunas reducen la INMDA mientras que otras la potencian. El análisis estadístico muestra que hay una pequeña, pero significativa diferencia entre el efecto de las regiones, en el inserto se muestra el efecto de la región sobre la INMDA (promedio de los efectos), se observa que numéricamente la región AcbC tiene un efecto mayor que el AcbS y DSL.

Debido a que se encontró un efecto principal entre las regiones de estudio, para determinar entre que áreas existe una diferencia estadística, se realizó una *post hoc* de Tukey, con la que se encontró una significancia entre las regiones DSL vs AcbC con una  $p=0.017$ . A pesar de esto, los datos no arrojan información que se pueda contextualizar en el modelo de conducta sexual usado en este estudio, además, la respuesta a diferentes concentraciones de E<sub>2</sub> no difirió significativamente entre las tres regiones cerebrales (interacción concentración\*región ( $p=0.650$ )), por lo que los datos de cada concentración fueron considerados en conjunto y se construyó la gráfica 10. También se encontró un efecto principal significativo en la concentración, por lo que se compararon entre pares de dosis a través de una prueba *post hoc* de Tukey. Sin embargo, este análisis no arrojó datos significativos para ninguna de las concentraciones (ver tabla 19). Adicionalmente, a estos datos se les aplicó una prueba T de una



muestra, los datos indican que solo la concentración de 100 nM es significativamente diferente de 0,  $t_{(22)} = 2.679$ ,  $p = 0.014$  (0 = ausencia de respuesta).



Gráfica 28. Efecto de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA en las MSN's de ratas sin un pretratamiento con BE<sub>2</sub>. Se graficó el promedio  $\pm$  EEM. Se muestra que la respuesta no es dependiente de la dosis. El análisis estadístico muestra que no hay diferencia significativa entre las concentraciones, y solo 100 nM tiene un efecto diferente de 0. Para mayor detalle del

**Tabla 19. Resumen de los resultados de las pruebas de Tukey y T de Student de una muestra**

Concentración P <sub>4</sub>	0.3nM	1 nM	3 nM	10 nM	30 nM	100 nM	300 nM	T de una muestra
0.1 nM (n=13)	1	1	0.666	1	0.439	1	0.388	0.156
0.3 nM (n=13)		1	0.800	1	0.620	0.999	0.546	0.328
1 nM (n=11)			0.87	1	0.751	0.998	0.668	0.479
3 nM (n=10)				0.769	1	0.373	1	0.242
10 nM (n=23)					0.499	0.993	0.455	0.186
30 nM (n=24)						0.111	1	0.168

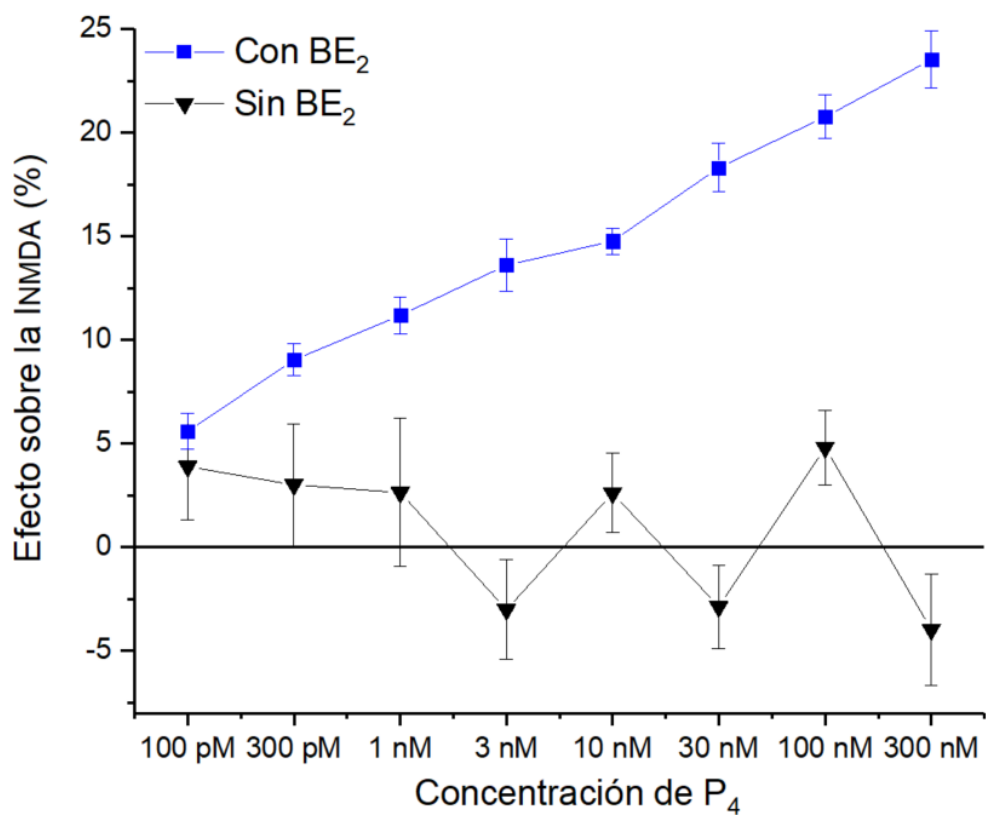
<i>100 nM (n=23)</i>							0.124	0.014
<i>300 nM (n=14)</i>								0.165

*Prueba de Tukey entre regiones*

<i>Área</i>	DSL	AcbC	AcbS
<i>DSL</i>	<b>X</b>	0.017	0.481
<i>AcbC</i>	0.017	<b>X</b>	0.179
<i>AcbS</i>	0.481	0.179	<b>X</b>

\*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; \* $p \leq 0.05$

Derivado de los datos anteriores, se graficaron los efectos de la concentración sobre la INMDA (Gráfica 29) con y sin un pretratamiento con el BE<sub>2</sub>. Podemos observar que todas las concentraciones probadas cuando el animal recibe un pretratamiento con BE<sub>2</sub>, son diferentes de cero (t de una muestra,  $p=0.0001$ ). Esto no ocurre cuando no hay un pretratamiento, donde la única respuesta significativa la encontramos en 100 nM (t de una muestra,  $p=0.014$ ). El efecto principal de la concentración para ambos tratamientos resultó estadísticamente significativo (Con BE<sub>2</sub>  $p=0.0001$ , Sin BE<sub>2</sub>  $p=0.031$ ) y la diferencia entre los tamaños de efecto ( $\eta^2_p = 0.669$  y  $\eta^2_p = 0.131$  respectivamente) es muy grande, es decir, el pretratamiento con BE<sub>2</sub> incrementó fuertemente la respuesta de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA ( $0.669/0.131=5.10$  veces más o 510%).



Gráfica 29. Efecto de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA en las MSN's de ratas con y sin un pretratamiento con BE<sub>2</sub>. Se graficó el promedio ± EEM. Se muestra que, cuando hay un pretratamiento, la respuesta es dependiente de la dosis, sin embargo, sin el BE<sub>2</sub>, la respuesta de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA no es diferente de 0 en la mayoría de las concentraciones. La diferencia entre los tamaños de efecto muestra que el pretratamiento con BE<sub>2</sub> facilita la modulación de la P<sub>4</sub> sobre la actividad de la corriente glutamatérgica tipo NMDA

## 7) DISCUSION:

A través del uso de la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa, mostramos que el estradiol (E<sub>2</sub>) y la progesterona (P<sub>4</sub>) tienen un efecto rápido (a los segundos de aplicación, asociado a mecanismos no genómicos) de reducción sobre la corriente activada por NMDA (INMDA), en neuronas espinosas medianas (MSN's) agudamente disociadas de las tres subregiones del estriado disecadas de la rata ovariectomizada (OVX). Este efecto mostró dosis-dependencia para la mayoría de los grupos, a excepción del que fue estudiado con P<sub>4</sub> sin pretratamiento con BE<sub>2</sub> (Gráficas 25 y 28). Por otra parte, los resultados no mostraron diferencias significativas entre la respuesta al E<sub>2</sub> o a la P<sub>4</sub> de los MSN's de las tres distintas regiones examinadas: el estriado dorsolateral (DSL), y las regiones *core* (AcbC) y *shell* (AcbS) del núcleo accumbens.

En el presente trabajo, se hizo uso de un modelo animal (rata OVX administrada con una dosis de BE<sub>2</sub>) que ha sido ampliamente utilizado para estudiar la neuroendocrinología de la conducta sexual femenina, desde principios del siglo XX (Beyer *et al.*, 1988; Barfield & Chen 1977; Rubin & Barfield, 1983; Clark, 1993). Canónicamente se ha demostrado que un pretratamiento con BE<sub>2</sub> por lo menos 48 horas antes de la aplicación de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en las ratas OVX, es necesario para inducir una máxima expresión de la conducta de estro (González-Flores *et al.*, 2015).

Varios estudios han mostrado que la dosis “*priming*” de BE<sub>2</sub> funciona para preparar el sustrato neuronal de la conducta de estro para responder a el E<sub>2</sub> y a la P<sub>4</sub>. Se sabe que una función central del pretratamiento en este modelo es inducir la expresión de receptores a progesterona (RP) y al mismo estradiol (RE) en diferentes áreas como el hipotálamo, el área preóptica medial, entre otras, asociadas con la reproducción (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994), permitiendo así un restablecimiento de los circuitos neurales para la respuesta a estas hormonas (González-Flores *et al.*, 2015). De esta manera, se ha demostrado que la rata OVX pretratada con BE<sub>2</sub>, mimetiza neuroendocrinológica y conductualmente, a la rata intacta en la fase del proestro. Al ocupar este modelo en el presente trabajo, hace posible interpretar los resultados dentro de este contexto neuro-conductual relevante y definido.

Mediante nuestros resultados, podemos sugerir que este tratamiento también unifica la respuesta del sistema glutamatérgico, en las MSN's de la rata. Si bien es cierto que se ha demostrado que la conducta sexual está regulada por la actividad de diversas vías de señalización que involucran a las cinasas, como la proteína cinasa A y G (PKA, PKG) y la SRC (Domínguez-Ordóñez, 2017), nuestros resultados plantean la posibilidad de que estas hormonas estén regulando la actividad de otros receptores, como los dependientes de ligando (ionotrópico), como lo hacen con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Mermelstein *et al.*, 1996; Luoma *et al.*, 2011).

El modelo animal que se utilizó en el presente trabajo nos permite además estudiar la electrofisiología de los receptores NMDA expresados por los MSN's. Existe evidencia de que la OVX no afecta la expresión del receptor glutamatérgico NMDA (NMDAR) en las tres regiones delimitadas para este estudio, estriado DSL, AcbC y AcbS. Cyr *et al.*, en el 2000 y el 2001 mostraron que la expresión de los NMDAR permanece constante a las 2 semanas y a los 10 meses después de la cirugía OVX en el estriado dorsal y ventral; en contraste con otras regiones como el hipocampo, donde ha reportado un aumento en el ARNm de las subunidades del NMDAR, hecho que sugiere un recambio de subunidades del receptor (Adams *et al.*, 2001). Interesantemente, ambos estudios muestran que un tratamiento subcrónico por vía subcutánea (2 semanas) con  $\text{E}_2$  y la  $\text{P}_4$  en la rata OVX, reduce la interacción del radioligando específico en el estriado dorsal y ventral, proponiendo una modulación directa sobre el NMDAR en las MSN's.

### *Estriado*

La mayoría de las investigaciones utilizando el modelo de la rata OVX, se han centrado en el estudio de las hormonas ováricas en un contexto de la modulación de la conducta de lordosis (conducta receptiva). Aparte de la lordosis, la conducta de estro en la rata también involucra conductas *proceptivas*, mismas que han sido menos estudiadas bajo este contexto (como movimiento rápido de las orejas, carreras cortas, brincos; Willet *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2018). Las conductas proceptivas son conductas apetitivas, desplegadas por la hembra con el fin de comunicar al macho su receptividad. El estriado ha cobrado relevancia por ser el uno de los principales núcleos encargados de la regulación de las conductas motivadas (como las

conductas proceptivas) y recientemente se ha considerado como un área sexualmente dimórfica cuya actividad se ve regulada por las fluctuaciones hormonales a lo largo del ciclo estral (Yoest *et al.*, 2018).

Se ha estudiado que estas hormonas aumentan la liberación de dopamina de una forma ligada al sexo (DA; Dluzen & Ramírez, 1984; Becker, 1990; Pfau & Jones, 2015; Mermelstein & Becker 1995) en el circuito local del estriado, pues esto no se ve replicado en otras áreas, como la corteza prefrontal en modelos *in vivo* (Shams *et al.*, 2016). Este proceso impacta directamente sobre algunas conductas como un aumento en la locomoción, la mejora en la realización de una tarea, la coordinación de movimientos, entre otras (Becker 1987, 1990; Krentzel & Meitzen, 2018).

El estriado DSL forma parte del circuito de los ganglios basales y está implicado en el establecimiento, regulación y expresión de comportamientos de hábitos, que son patrones repetitivos y secuenciales; particularmente integra la información sensorial y motora en los procesos para alcanzar un objetivo y es esencial para el control y la coordinación de los movimientos (Yoest *et al.*, 2014; Florio, 2020). Por otro lado, el estriado ventral está conformado principalmente por el núcleo accumbens, el cual se subdivide en las regiones *core* (AcbC) y *shell* (AcbS), y es un componente central del sistema mesocorticolímbico. Debido al papel central de las MSN's en la modulación de la conducta, su rol como integrador de neurotransmisión glutamatérgica y otras señales neuroquímicas, y su expresión de receptores al E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, el presente estudio se enfocó en caracterizar los efectos moduladores del E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> sobre la corriente activada por NMDA.

Aunque nuestros antecedentes sugirieron una diferencia en la respuesta de las MSN's de cada subregión, nuestros resultados muestran que la modulación de la INMDA por el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub>, no difiere significativamente entre el estriado DSL y el núcleo accumbens; sin embargo, demuestra una clara modulación de la neurotransmisión glutamatérgica por estas hormonas. A continuación, la discusión se presenta primero con respecto al E<sub>2</sub> y posteriormente con respecto a la P<sub>4</sub>

### *Estradiol*

En el presente estudio, se observó una respuesta, dependiente de la dosis e inhibitoria, de la aplicación del E<sub>2</sub> sobre la INMDA cuando el sistema neuronal es reestablecido con un

pretratamiento con  $BE_2$  (Gráfica 13). Esta respuesta es importante en el contexto del ciclo estral, debido a que se emplearon concentraciones fisiológicas, que mimetizan las fluctuaciones séricas de estas hormonas entre dos ovulaciones. Otra observación importante derivada de este estudio es que el efecto del  $E_2$  sobre la INMDA se produjo a los segundos de aplicación (respuesta rápida, no genómica) y que dicho efecto fue parcialmente lavable, hecho que muestra que la respuesta fue debida a la presencia del  $E_2$  en el medio celular.

Se ha demostrado que las ratas OVX expuestas a una administración subcutánea de  $E_2$ , aumenta los potenciales de acción en el estriado *in vivo* (Arnauld *et al.*, 1981; Tansey *et al.*, 1983). Sin embargo, estos estudios no consideran específicamente a las MSN's, sino también a las interneuronas medianas no espinosas y a las gigantes colinérgicas. Otros estudios que específicamente evaluaron la actividad de las MSN's muestran que el  $E_2$  a una concentración fisiológicas de 100 pM, regula en milisegundos la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L, reduciendo la entrada de este ion a la célula, este estudio concluye que la modulación es debida a una interacción del  $E_2$  con un receptor membranal (Mermelstein *et al.*, 1996). Nuestros resultados son consistentes con este estudio pues muestran un efecto ejercido por el  $E_2$  sobre la INMDA después de unos segundos de aplicación, por lo que podemos especular que el mecanismo de regulación es a nivel membranal. Esta hipótesis también se sustenta en el hecho del lavado parcial del efecto, puesto que, si el mecanismo fuera mediante interacciones intracelulares, resultaría difícil observarlo a los segundos de retirar el ligando, en este caso el  $E_2$ .

Existen pocos estudios sobre como el  $E_2$  modula a los receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) en el estriado. Wong y Moss (1994) mediante registros electrofisiológicos de canal unitario en neuronas disociadas de hipocampo, estudiaron la frecuencia de apertura de los iGluR's NMDA, AMPA y Kainato, al aplicar 100 nM de  $E_2$  y no observaron cambios en este parámetro ni en la amplitud de la corriente, por lo que concluyen que esta hormona no tiene un efecto sobre la actividad de los iGluR's.

Por otra parte, Weaver (*et al.*, 1997) mostró que la INMDA disminuía en presencia de  $E_2$  50  $\mu$ M, en neuronas cultivadas del hipocampo de embriones de rata; este autor sugiere una modulación directamente sobre el NMDAR. La diferencia entre ambos estudios puede ser atribuida a diversos factores como el sexo del animal de estudio, pues el primero fue realizado

en machos y el segundo no lo especifica. Otro factor puede ser la concentración empleada en el segundo estudio, puesto que no es una concentración fisiológica.

Nuestro estudio emplea un rango fisiológico de  $E_2$  que mimetizan el ciclo estral en la rata, y encontramos una dosis-dependencia en la reducción de la respuesta al NMDA en las ratas pretratadas con  $BE_2$ , esto también puede deberse a que los estudios mencionados se realizaron en una región cerebral diferente a la de este estudio. Además, es relevante mencionar que, la respuesta es independiente o no está influenciada por otros tipos celulares (neuronas o astrocitos) puesto que nuestro modelo de estudio nos permite mantener aislada a la célula para su estudio.

Cuando el modelo experimental no recibe el pretratamiento con  $BE_2$ , la respuesta del  $E_2$  sobre la INMDA, muestra un efecto bifásico, donde las concentraciones más bajas probadas en el estudio, potenciaron la INMDA, mientras que las más altas redujeron la INMDA (Gráficas 11 y 15). Sin embargo, en la gráfica 16 se aprecia que la concentración de 10 pM de  $E_2$  alcanza una respuesta similar con y sin el pretratamiento, y podemos hipotetizar que, si aumentamos la concentración de  $E_2$ , eventualmente se podría alcanzar el mismo efecto. Este hecho concuerda con lo reportado en la literatura, donde se muestra que para emular las conductas receptivas (en ratas sin  $BE_2$ ), se requieren tratamientos con concentraciones supra fisiológicas o la administración repetida de dosis bajas de  $E_2$ , para alcanzar la expresión de la conducta de lordosis (Clark 1993; Kauffman, 2018). Estos datos también nos sugieren que el pretratamiento con  $BE_2$  podría estar modulando la sensibilidad de los NMDAR (Weiland, 1992) o la expresión de algunas subunidades, como en otras regiones cerebrales como el hipocampo (Gazzaley *et al.*, 1996). Sin embargo, estos procesos en el estriado no han sido estudiados.

### *Progesterona*

El efecto que ejerce la  $P_4$  sobre la actividad de las MSN's ha sido poco estudiado. Nuestros resultados muestran que un pretratamiento con  $BE_2$  aumenta fuertemente el efecto de la de esta hormona sobre la actividad glutamatérgica tipo NMDA. Se sabe que el comportamiento proceptivo como el brincoteo y las carreras cortas, aumentan su frecuencia (eventos por minuto) proporcionalmente al incrementar los niveles de  $P_4$  (Tennent *et al.*, 1980).



También se ha estudiado que la aplicación de P<sub>4</sub> (y también de E<sub>2</sub>) regula la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos en el estriado, pues 4 horas después de la exposición a esta hormona hay una disminución de la afinidad del ligando [3H]spiroperidol (antagonista) por los receptores tipo D2, en las ratas pretratadas con BE<sub>2</sub>, mientras que hay un aumento después de 24 horas de aplicación (Fernández-Ruíz *et al.*, 1988). Este hecho podría sugerir la preparación del sistema para favorecer la vía directa del sistema de GB y así coordinar las conductas motivadas observadas en el ciclo estral (Yoest *et al.*, 2018). Además, se ha estudiado que la activación de los receptores D1 se asocia a un reforzamiento positivo de una conducta mientras que los D2, se ven involucrados en el condicionamiento aversivo (Soares-Cunha *et al.*, 2016).

Con respecto a la modulación de la P<sub>4</sub> sobre la actividad de las MSN's hay poca evidencia, sin embargo, se ha propuesto que el principal efecto que ejerce sobre esta población neuronal, es a través de la modulación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje más no por una relación con otras poblaciones de receptores. Se ha mostrado que el principal metabolito de la P<sub>4</sub>, la alopregnanolona, no tiene un efecto sobre la modulación de esta corriente de Ca<sup>2+</sup> (Luoma *et al.*, 2012).

También, se ha estudiado el efecto de la P<sub>4</sub> (50µM) sobre la actividad de los receptores AMPA y NMDA en MSN's cultivadas de ratas neonatas (posnatal P0 y P1) y se reportó que dicha hormona no modifica la INMDA, sin embargo, aumenta la IAMPA (glutamatérgica) en un 30% (Luoma *et al.*, 2011). En contraste, nuestros datos sugieren una modulación dosis-dependiente de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA, con un efecto de reducción de dicha corriente en todas las concentraciones probadas en las ratas que recibieron un pretratamiento con BE<sub>2</sub> y sin ningún efecto en casi todas las concentraciones probadas en ratas sin la aplicación de BE<sub>2</sub>. Una de las principales diferencias con este trabajo, es la edad de los animales de estudio, nuestros sujetos experimentales fueron ratas hembras adultas, donde la expresión de las subunidades del NMDAR (GluNR1, GluNR2A-D) llegan a su máxima expresión. En edades P0-P10, la subunidad GluNR2A incrementa moderadamente, mientras que llega a su máxima expresión a las 3 semanas de edad; Así mismo, GluNR2B alcanza su máxima expresión a los 21 días de edad, mientras que en edades P0-P10, es baja o moderada en el estriado (Monyer *et al.*, 1994; Wenzel *et al.*, 1997). También existen estudios que, mediante herramientas de acoplamiento molecular, muestran que la P<sub>4</sub> puede unirse fuertemente a la interfase formada entre las

subunidades GluNR1 - GluNR2A y B, principales isoformas presentes en el estriado (Tameh *et al.*, 2018) y si durante el desarrollo existe un cambio de expresión de estas subunidades, podría ser una variable biológica que incida sobre la respuesta de esta hormona en la actividad del NMDAR. Estos resultados de acoplamiento molecular coinciden con los que realizamos en labor conjunta con el laboratorio de síntesis y química orgánica (BUAP) a cargo del Dr. Jesús Sandoval (datos no mostrados), donde obtuvimos que tanto el E<sub>2</sub> como la P<sub>4</sub>, pueden unirse fuertemente en la subunidad GluN2 del NMDAR.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que el pretratamiento con BE<sub>2</sub> incrementa fuertemente la respuesta de la P<sub>4</sub> sobre la INMDA (510% más). Esta observación es consistente con lo reportado con la literatura, donde un previo tratamiento con BE<sub>2</sub> seguido de la administración de P<sub>4</sub>, maximiza las conductas de proestro-estro, por lo que se enfatiza que, la proceptividad es facilitada por la P<sub>4</sub> y no por el E<sub>2</sub>. Además, la P<sub>4</sub> administrada en ausencia de un pretratamiento, se sabe que no estimula la conducta sexual en la rata (Clark, 1993), hecho que podemos observar en la gráfica 28, en donde el análisis estadístico muestra que la mayoría de las concentraciones empleadas en este estudio, no son significativamente diferentes de 0.

En conjunto estos datos muestran una menor excitabilidad en las MSN's del estriado dorsal y ventral. En la región DSL, esto implicaría una menor inhibición del circuito local, hecho que facilitaría la liberación por volumen de dopamina en esta región, esto a su vez incidiría sobre la vía indirecta de los ganglios basales, asociados a una inhibición del movimiento por la actividad de los receptores dopaminérgicos de la familia D2. Sin embargo, Fernández-Ruíz (*et al.*, 1988) propone que los receptores a DA oscilan en su expresión durante todo el ciclo estral. Utilizando como radioligando al [3H]spiroperidol (antagonista dopaminérgico de la familia D2), demostró que después de 4 horas de exposición a E<sub>2</sub> vía subcutánea, hay un decremento en la expresión del receptor, mientras que 24 horas después se alcanza la expresión máxima. Yoest (*et al.*, 2019) reporta que en la transición del proestro-estro, la densidad de expresión de receptores D2 está disminuida, alcanzando su máxima expresión al finalizar la fase de estro. Este fenómeno podría estar asociado al efecto temporal de las hormonas sobre las MSN's, mismas que podrían estar relacionadas con la conducta sexual de la rata, pues en la fase de proestro-estro hay un incremento de las conductas exploratorias y motoras, marcando un aumento en la receptividad sexual.

Proaño (*et al.*, 2020) muestra que la actividad de las MSN's del núcleo accumbens, en el estro está disminuida. Tras estudiar los potenciales sinápticos excitadores evocados en esta población neuronal en presencia de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, determinó que la amplitud de estos estímulos son menores comparados con las otras fases del ciclo estral. Al mismo tiempo encontró que la rheobase (parámetro electrofisiológico que estima la cantidad de corriente mínima para alcanzar el umbral) se correlaciona positivamente con la concentración de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> circulante, por lo tanto, dichas hormonas reducen la excitabilidad intrínseca de las MSN's. Esto concuerda con nuestros resultados, pues uno de los principales receptores asociados al componente tardío de los potenciales sinápticos excitadores es precisamente el NMDAR, nuestros resultados muestran una disminución en la actividad de este receptor asociado a la presencia de estas hormonas.

La reducción de la actividad de las MSN's ha sido estudiado dentro de un contexto de estímulo-recompensa asociado a la comida. Baumgartner (*et al.*, 2020) demostraron que los antagonistas glutamatérgicos en el accumbens aumentan la conducta motivacional. Mediante el uso de ratas transgénicas, a las cuales se les indujo la expresión de un canal inespecífico de iones, tipo rodopsina sensible a un láser azul, se observó que en presencia de un antagonista glutamatérgico (DNQX, mediante una cánula dirigida al accumbens), el consumo de alimento en los animales incrementó alrededor del 300%, comparado con las ratas que recibieron solución salina. Bajo estas mismas condiciones experimentales, se estimuló la apertura del canal tipo rodopsina al aplicar el haz luminoso, permitiendo reestablecer la actividad de las MSN's (por entrada de sodio y calcio) y previniendo el efecto de antagonista. Este estudio podría dar un indicio sobre como la inhibición local en el circuito del accumbens es necesaria para la expresión de conductas motivadas, hecho que concuerda con los datos obtenidos en este trabajo, pues se obtuvo claramente una reducción de la actividad de las MSN's mediante la disminución de la INMDA.

## 8. CONCLUSIONES:

1. El E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> tienen un efecto modulador sobre la corriente de NMDA a concentraciones fisiológicas, similares a las del ciclo estral.
2. El E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub> reducen en acción de segundos la corriente activada por NMDA, sugiriendo la interacción con un receptor membranal en las neuronas espinosas medianas de las tres subregiones del estriado.
3. El efecto de reducción de la corriente de NMDA no es dependiente, ni de otros cuerpos celulares, ni de otras moléculas de señalización.
4. La reducción de la corriente de NMDA presentó una dosis-dependencia en la mayoría de los grupos experimentales, a excepción del grupo no pretratado con BE<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>
5. La modulación de la corriente de NMDA no difiere significativamente entre las tres subregiones del estriado.

## REFERENCIAS

1. **Almey A.**, Milner, T. A., & Brake, W. G. (2016). Estrogen receptor  $\alpha$  and G-protein coupled estrogen receptor 1 are localized to GABAergic neurons in the dorsal-striatum. *Neuroscience-letters*, 622, 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.023>
2. **Arnauld E.**, Dufy B., Pestre M. & Vincent, JD. (1981). Effects of estrogens on the responses of caudate neurons to microiontophoretically applied dopamine. *Neurosci. letters*, 21(3), 325-331. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(81\)90225-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(81)90225-1)
3. **Camacho-Arroyo, I.**, Pérez-Palacios, G., Pasapera, A. M., & Cerbón, M. A. (1994). Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 50(5-6), 299-303. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(94\)90135-x](https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)90135-x)
4. **Ávila-Ruiz, T.**, Carranza, V., Gustavo, L. L., Limón, D. I., Martínez, I., Flores, G., & Flores-Hernández, J. (2014). Chronic administration of nicotine enhances NMDA-activated currents in the prefrontal cortex and core part of the nucleus accumbens of rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 68(6), 248-256. <https://doi.org/10.1002/syn.21726>.
5. **Basar, K.**, Sesia, T., Groenewegen, H., Steinbusch, H. W., Visser-Vandewalle, V., & Temel, Y. (2010). Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in neurobiology*, 92(4), 533-557. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.08.007>
6. **Beach FA.** (1976). Sexual attractiveness, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7: 105-138. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(76\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0018-506x(76)90008-8)
7. **Becker J. B.** (1990). Direct effect of 17 beta-estradiol on striatum: sex differences in dopamine release. *Synapse (New York, N.Y.)*, 5(2), 157-164. <https://doi.org/10.1002/syn.890050211>
8. **Beyer C,** Hoffman KL & González-Flores O. (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Hormones and behavior*, 52: 2-11. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.027>
9. **Beyer C.**, González-Flores O., García-Juárez M., & González-Mariscal G. (2003). Non-ligand activation of estrous behavior in rodents: cross-talk at the progesterone receptor. *Scandinavian journal of psychology*, 44(3), 221-229. <https://doi.org/10.1111/1467-9450.00339>
10. **Blas De La Peña M.** (2012) Glucocorticoides e interacción de neurotransmisores en el Núcleo Accumbens: efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento. Tesis Inédita De La Universidad Complutense De Madrid, Facultad De Ciencias Biológicas. <https://eprints.ucm.es/14564/1/T33263.pdf>

11. **Calabresi P.**, Pisani A., Centonze D., & Bernardi, G. (1997). Synaptic plasticity and physiological interactions between dopamine and glutamate in the striatum. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(4), 519-523.  
[https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(96\)00029-2](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(96)00029-2)
12. **Cao J.**, Willett J.A., Dorris D. M., & Meitzen J. (2018). Sex differences in Medium Spiny Neuron excitability and glutamatergic synaptic input: heterogeneity across Striatal Regions and evidence for estradiol-dependent sexual differentiation. *Frontiers in endocrinology* 9, 173. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00173>
13. **Chuhma, N.**, Mingote, S., Kalmbach, A., Yetnikoff, L., & Rayport, S. (2017). Heterogeneity in dopamine neuron synaptic actions across the striatum and its relevance for schizophrenia. *Biological psychiatry*, 81(1), 43–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.07.002>
14. **Clark JT.** (2013) Capítulo 4: Analysis of female sexual behavior: proceptivity, receptivity, and reaction. Editor: Conn, PM. In: Paradigms for the Study of Behavior (Vol. 14). *Academic Press*.
15. **Compagnone NA.**, & Mellon SH. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(1), 1-56.  
<https://doi.org/10.1006/frne.1999.0188>
16. **Cora, MC.**, Kooistra L. & Travlos G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793.  
<https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
17. **Cornil CA.**, Ball, G. F. & Balthazart, J. (2006). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain-research*, 1126(1).2–26. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.07.098>
18. **Cover KK.**, Maeng LY., Lebrón-Milad K. & Milad MR. (2014). Mechanisms of estradiol in fear circuitry: implications for sex differences in psychopathology. *Translational-psychiatry*, 4(8),422.  
<https://doi.org/10.1038/tp.2014.67>
19. **Cui J.**, Shen Y. & Li R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 19(3), 197–209.  
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
20. **Cyr M.**, Ghribi O., & Di Paolo T. (2000). Regional and selective effects of Oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *Journal of neuroendocrinology*, 12(5), 445–452. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00471.x>
21. **Cyr M.**, Thibault C., Morissette M., Landry, M. & Di Paolo, T. (2001). Estrogen-like activity of tamoxifen and raloxifene on NMDA receptor binding and expression of its subunits in rat brain. Official publication of *the American College of*

- Neuropsychopharmacology*, 25(2), 242–257. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00233-0)
22. **Dingledine R.**, Borges K., Bowie D. & Traynelis, SF. (1999). The Glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51(1), 7–61.
  23. **Dluzen DE.** & Ramirez, VD. (1984). Bimodal effect of progesterone on in vitro dopamine function of the rat corpus striatum. *Neuroendocrinology*, 39(2), 149–155. <https://doi.org/10.1159/000123971>
  24. **Dluzen DE.** & Ramirez, VD. (1989). Progesterone effects upon dopamine release from the corpus striatum of female rats. II. Evidence for a membrane site of action and the role of albumin. *Brain research*, 476(2), 338–344. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91255-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91255-9)
  25. **Dluzen DE.** & Ramirez, VD (1990). In vitro progesterone modulation of amphetamine-stimulated dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated female rats: response characteristics. *Brain research*, 517(1-2), 117–122. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91016-a](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91016-a)
  26. **Do Rego JL.**, Seong JY., Burel D., Leprince J., Luu-The V., Tsutsui K., Tonon MC., Pelletier G. & Vaudry H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(3), 259-301. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.006>
  27. **Domínguez-Ordóñez R.** (2017). Mecanismos celulares involucrados en la estimulación de la conducta de lordosis inducida por la administración de estradiol en la rata. TESIS DOCTORAL. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
  28. **Domínguez-Ordóñez R.**, García-Juárez M., Lima-Hernández F. J., Gómora-Arrati P., Blaustein, J. D. & González-Flores O. (2015). Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: Dependence on estrogen and progestin receptors and priming dose of estradiol benzoate. *Behavioral neuroscience*, 129(6), 777–788. <https://doi.org/10.1037/bne0000103>
  29. **Dunah, A.W.** & Standaert, D.G. (2003). Subcellular segregation of distinct heteromeric NMDA glutamate receptors in the striatum. *Journal of Neurochemistry*, 85: 935-943. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01744.x>
  30. **Evans, R. C.**, Morera-Herreras, T., Cui, Y., Du, K., Sheehan, T., Kotaleski, J. H., Venance, L., & Blackwell, K. T. (2012). The effects of NMDA subunit composition on calcium influx and spike timing-dependent plasticity in striatal medium spiny neurons. *PLoS computational biology*, 8(4), e1002493. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002493>
  31. **Fernández-Espejo E.** (2000). ¿Cómo Funciona El Nucleus Accumbens? *Revista De Neurología*; 30 (9): 845-849.

32. **Flores-Hernández J.**, Salgado, H., De La Rosa, V., Avila-Ruiz, T., Torres-Ramírez, O., Lopez-Lopez, G. & Atzori, M. (2009). Cholinergic direct inhibition of N- Methyl-D Aspartate receptor-mediated currents in the rat neocortex. *Synapse*, 63(4), 308–318. <https://doi.org/10.1002/syn.20609>
33. **Flores-Soto M. E.**, Chaparro-Huerta V., Escoto-Delgadillo M., Vazquez-Valls E., González-Castañeda RE., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 27(5)301–310. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2011.10.014>
34. **Forlano P.M. & Woolley, C.S. (2010)**, Quantitative analysis of pre- and postsynaptic sex differences in the nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.*, 518: 1330-1348. <https://doi.org/10.1002/cne.22279>
35. **Francis T.C. & Lobo M.K.(2017)**. Emerging role for Nucleus Accumbens Medium Spiny Neuron subtypes in depression. *Biological psychiatry*, 81(8), 645–653. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.09.007>
36. **Freeman M. (2006)**. Capítulo 43: The neuroendocrine control of ovarian cycle of the rat. En: The physiology of reproduction. *Raven Press*, New York.
37. **García-Delgado P. (2007)**. Guía de utilización de anticonceptivos hormonales. Artículos De Revistas. *Med Clin (Barc)*. 128(8):281-90. ISBN: 84-690-2739-5.
38. **Gardner D., Shoback D. (2013)**. Endocrinología básica y clínica de Greenspan. México: *McGraw-Hill* Interamericana Editores, S.A. de C.V.
39. **González-Flores O., García-Juárez M. & Domínguez-Ordóñez R. (2015)**. Las hormonas y la conducta sexual femenina. *Revista Ciencia* pg 24-29.
40. **González-Jatuff SA., Torrecilla M., Quercetti M., Zapata MP. & Rodríguez-Echandía EL. (2012)**. Influence of the estrous cycle on some non-reproductive behaviors and on brain mechanisms in the female rat. *Interdisciplinaria*, 9(1),63-77.
41. **Grove-Strawser D., Boulware M. I. & Mermelstein P. G. (2010)**. Membrane estrogen receptors activate the metabotropic glutamate receptors mGluR5 and mGluR3 to bidirectionally regulate CREB phosphorylation in female rat striatal neurons. *Neuroscience*, 170(4),1045–1055. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.012>
42. **Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R & Camacho-Arroyo I. (2003)**. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 15: 984-990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01088.x>
43. **Jones S. L., Farrell S., Gregory J. G. & Pfaus, J. G. (2013)**. Sensitization of sexual behavior in ovariectomized rats by chronic estradiol treatment. *Hormones and behavior*, 64(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.04.012>



44. **Kauffman AS. & Micevych PE.** Female Sexual Behavior and Hormones in Mammals (2019), Editor(s): Jae Chun Choe, Encyclopedia of Animal Behavior (Second Edition), Academic Press, Páginas: 403-419, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20687-0>.
45. **Krentzel A. & Meitzen J. (2018).** Biological sex, estradiol and striatal medium spiny neuron physiology: a mini-review. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 492.<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00492>
46. **Krentzel AA, Willett, JA, Johnson, AG, Meitzen, J. (2021)** Estrogen receptor alpha, G-protein coupled estrogen receptor 1, and aromatase: Developmental, sex, and region-specific differences across the rat caudate–putamen, nucleus accumbens core and shell. *J Comp Neurol.* 2021; 529: 786– 801. <https://doi.org/10.1002/cne.24978>
47. **Kretz O., Fester L., Wehrenberg U., Zhou L., Brauckmann S., Zhao S., Prange-Kiel J., Naumann T., Jarry H., Frotscher M. & Rune, G. M. (2004).** Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(26), 5913–5921. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5186-03.2004>
48. **Kupchik Y.M & Kalivas PW. (2017).** The direct and indirect pathways of the nucleus accumbens are not what you think. *Neuropsychopharmacology: official publication of American College of Neuropsychopharmacology*,42(1), 369–370. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.160>
49. **Küppers E, Beyer C. (1998)** Expression of aromatase in the embryonic and postnatal mouse striatum. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Dec 10;63(1):184-8. doi: 10.1016/s0169-328x(98)00279-4. PMID: 9838103.
50. **Landwehrmeyer, G. B., Standaert, D. G., Testa, C. M., Penney, J. B., & Young, A. B. (1995).** NMDA receptor subunit mRNA expression by projection neurons and interneurons in rat striatum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(7Pt2), 5297–5307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-05297.1995>
51. **Lee-Rivera I., & Lopez-Colomé, AM. (2005).** Relación de la estructura de los receptores NMDA con su función en la retina. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas* 8(2), 71–81.
52. **Lévesque D. & Di Paolo T. (1990).** Effect of the rat estrous cycle at ovariectomy on striatal D-1 dopamine receptors. *Brain research bulletin*, 24(2), 281–284. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90216-m](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90216-m)
53. **Lewis Maynard R. & Downes N. (2019).** Capítulo 19 - Female Reproductive Tract, Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research, Academic Press, pág. 219-229, ISBN 9780128118375, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811837-5.00019-8>

54. **Liljeholm M., & O'Doherty J. P. (2012)**. Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends in cognitive sciences*, 16(9), 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.07.007>
55. **Luoma, JI., Kelley BG., & Mermelstein, PG. (2011)**. Progesterone inhibition of voltage-gated calcium channels is a potential neuroprotective mechanism against-excitotoxicity. *Steroids*, 76(9),845–855. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.013>
56. **Maeda KI, Ohkura S. & Tsukamura H. (2000)** Capítulo 9 - Physiology of Reproduction, Editor(s): Georg J Krinke, In Handbook of Experimental Animals, The Laboratory Rat, *Academic Press*, páginas 145-176.
57. **Matamales M., Bertran-Gonzalez J., Salomon L., Degos B., Deniau J.M., Valjent E., Hervé D. & Girault, J.A. (2009)**. Striatal medium-sized spiny neurons: identification by nuclear staining and study of neuronal subpopulations in BAC transgenic-mice. *PloS-one*, 4(3),e4770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004770>
58. **McGinnis MY., & Pfaff DW. (2012)**. Capítulo 20 – Sexual Behaviors, Editor(s): George Fink, Donald W. Pfaff & Jon E. Levine, In Handbook of Neuroendocrinology, *Academic Press*, páginas 485-495
59. **Meitzen J., Meisel R. L., & Mermelstein, P. G. (2018)**. Sex Differences and the Effects of Estradiol on Striatal Function. *Current opinion in behavioral sciences*, 23, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.03.007>
60. **Meitzen J., Pfllepsen K. R., Stern C. M., Meisel R. L., & Mermelstein, P. G. (2011)**. Measurements of neuron soma size and density in rat dorsal striatum, nucleus accumbens core and nucleus accumbens shell: differences between striatal region and brain hemisphere, but not sex. *Neurosci. Lett.* 487, 177–181. doi: 10.1016/j.neulet.2010.10.017
61. **Mermelstein P. G., Becker J. B., & Surmeier D. J. (1996)**. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *Journal of Neuroscience*, 16(2), 595-604. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-02-00595.1996>
62. **Meyer JS. & Quenzer LF. (2010)** .Psicofarmacología: Drogas, cerebro y comportamiento. Sunderland, Massachusetts: *Sinauer Associates, Inc.* 163-165.
63. **Micevych P. E., Mermelstein, P. G., & Sinchak, K. (2017)**. Estradiol membrane-initiated signaling in the brain mediates reproduction. *Trends in neurosciences*, 40(11), 654–666. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.09.001>
64. **Micó J.A., Moreno Brea M.R., Roca Vinardell A., Rojas Corrales M.O., A. Ortega Alvaro. (2000)**. Prevención Del Tabaquismo Vol. 2 N° 2, septiembre Prev Tab; 2(2): 101-105.

65. **Moore** K.M., Oelberg W.L., Glass M.R., Johnson M.D., Been L.E., & Meisel R.L. (2019). Glutamate Afferents From the Medial Prefrontal Cortex Mediate Nucleus Accumbens Activation by Female Sexual Behavior. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 227.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00227>
66. **Nicola** S.M., Surmeier J. & Malenka RC. Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience*, 23, 185–215.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.185>
67. **Nicola**, S.M. (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology*, 191(3),521–550.  
<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0510-4>
68. **Paccola** CC., Resende C.G., Stumpp T., Miraglia S.M. & Cipriano I. (2018). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction* (AR), 10(4), 677-683.
69. **Paoletti** P., Bellone C., & Zhou Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(6), 383–400.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3504>
70. **Paoletti** P., & Neyton J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 7(1), 39–47.  
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.011>
71. **Paxinos** G. & **Watson** C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th Edition. 1997
72. **Pfaff** D. & **Keiner** M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. of comparative neurology*, 151(2), 121–158.  
<https://doi.org/10.1002/cne.901510204>
73. **Pfaus** JG., Jones SL., Flanagan-Cato LM., Blaustein JD. (2015). Capítulo 50 - Female Sexual Behavior, Editor(s): Tony M. Plant, Anthony J. Zeleznik, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition), *Academic Press*. Páginas 2287-2370, ISBN 9780123971753  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00050-8>.
74. **Popat** V.B., Prodanov T., Calis K.A., & Nelson L.M. (2008). The menstrual cycle a biological marker of general health in adolescents. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 43–51.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1429.040>
75. **Pozzo-Miller** LD., Inoue T. & Murphy DD. (1999). Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca<sup>2+</sup> transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J. of neurophysiology*, 81(3),1404–1411.  
<https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.3.1404>

76. **Prieto G.A.**, Villamar-Cruz O., Saqui-Salces M., Neri-Gómez T., Almaraz-Nieves A., Hernández-Molina V.I., Valdéz-Rodríguez H., & Camacho-Arroyo, I. (2003) ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación Química*, 14, 4.
77. **Proano, S. B.** (2020). Estrous Cycle and Ovarian Hormone Effects on Nucleus Accumbens Core Medium Spiny Neuron Physiology.
78. **Purves D.** (2004). *Neuroscience 3rd Edition. Sinauer Associates.* Pp. 426-427.  
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000154473.43364.47>
79. **Quesada A.**, Lee B.Y., & Micevych P.E. (2008). PI<sub>3</sub> kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Developmental neurobiology*, 68(5), 632–644.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.20609>
80. **Rekawiecki R.**, Kowalik M.K. & Kotwica J. (2017) Steroid Hormone Receptors in the Corpus Luteum. In: Meidan R. (eds) *The Life Cycle of the Corpus Luteum.* Springer, Cham. eBook ISBN: 978-3-319-43238-0  
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-43238-0>
81. **Rivas FJ.** & **Mir D.** (1990). Effects of nucleus accumbens lesion on female rat sexual receptivity and proceptivity in a partner preference paradigm. *Behavioural brain research*, 41(3), 239–249. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90111-q](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90111-q)
82. **Rusa R.**, Alkayed NJ., Crain BJ., Traystman RJ., Kimes AS., London ED., Klaus J.A., & Hurn P.D. (1999). 17beta-estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke*, 30(8), 1665–1670. <https://doi.org/10.1161/01.str.30.8.1665>
83. **Sasa M.**, Tsujiyama S., Ishihara K., Hanaya R., Fujita M., Kurisu K., Yajin K. & Serikawa T. (1996). Enhancement of GABA-Induced Current by 20-Hydroxy-Ecdysone in Cultured Cortical Neurons. In: Tanaka C., Bowery N.G. (eds) *GABA: Receptors, Transporters and Metabolism. Advances in Pharmacological Sciences.* Birkhäuser Basel
84. **Sazdanovic M.**, Mitrović S., Zivanovic-Macuzic I., Jeremić D., Tanaskovic I., Milosavljević Z., Malikovic A., Ognjanovic N., Sazdanović P., Jovanovic B., Jovanović J., Todorovic M.D., & Toševski J. (2013). Sexual dimorphism of medium-sized neurons with spines in human nucleus accumbens. *Archives of Biological Sciences*, 65, 1149-1155.
85. **Schwartz, N.B.** (2000). Capítulo 8: Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. In *Neuroendocrinology in physiology and medicine.* Páginas 135-145. Humana Press, Totowa, NJ.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59259-707-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-707-9_8)
86. **Soares-Cunha C.**, Coimbra B., Domingues A.V., Vasconcelos N., Sousa N. & Rodrigues A.J. (2018). Nucleus Accumbens Microcircuit Underlying D2-Msn-Driven Increase In Motivation. *eNeuro*, 5(2), ENEURO.0386-18.2018.  
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0386-18.2018>

87. **Sturm V.**, Lenartz D., Koulousakis A., Treuer H., Herholz KC, Klein JC. & Joachim K. (2005). The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *Journal of chemical neuroanatomy*, 26(4),293–299. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.09.003>
88. **Tameh, A. A.**, Karimian, M., Zare-Dehghanani, Z., Aftabi, Y., & Beyer, C. (2018). Role of Steroid Therapy after Ischemic Stroke by n-Methyl-d-Aspartate Receptor Gene Regulation. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association*, 27(11), 3066–3075. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.06.041>
89. **Tansey E. M.**, Arbuthnott G. W., Fink G., & Whale D. (1983). Oestradiol-17 beta increases the firing rate of antidromically identified neurones of the rat neostriatum. *Neuroendocrinology*, 37(2),106–110. <https://doi.org/10.1159/000123527>
90. **Tarazi F. & Baldessarini R.** (1999). Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *Journal of neuroscience research*, 55(4), 401–410. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990215\)55:4<401::AID-JNR1>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990215)55:4<401::AID-JNR1>3.0.CO;2-H)
91. **Tarazi F**, Campbell A, Yeghiayan S & Baldessarini, R. (1998). Localization of dopamine receptor subtypes in corpus striatum and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of D1- D2- & D4-like receptors. *Neuroscience*, 83(1), 169–176. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00386-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00386-2)
92. **Tarazi F.**, Campbell A., Yeghiayan S. & Baldessarini R. (1998). Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synapse (New York, N.Y.)*, 30(2), 227–235. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199810\)30:2<227::AID-SYN13>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199810)30:2<227::AID-SYN13>3.0.CO;2-Z)
93. **Taverna S.**, Van-Dongen Y.C., Groenewegen H. J., & Pennartz C.M. (2004). Direct physiological evidence for synaptic connectivity between medium-sized spiny neurons in rat nucleus accumbens in situ. *Journal of neurophysiology*, 91(3), 1111–1121. <https://doi.org/10.1152/jn.00892.2003>
94. **Taylor S.B.**, Anglin J.M., Paode P.R., Riggert A.G., Olive M.F. & Conrad C.D. (2014). Chronic stress may facilitate the recruitment of habit- and addiction-related neurocircuitries through neuronal restructuring of the striatum. *Neuroscience*, 280,231–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.029>
95. **Westwood F.R.** (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology*, 36(3), 375–384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>

96. **Willett J.A.**, Johnson A.G., Vogel A.R., Patisaul H.B., McGraw L.A. & Meitzen J. (2018). Nucleus accumbens core medium spiny neuron electrophysiological properties and partner preference behavior in the adult male prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Journal of neurophysiology*, 119(4), 1576–1588. <https://doi.org/10.1152/jn.00737.2017>
97. **Woolley C. S.**, & **McEwen, B. S.** (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 336(2), 293–306. <https://doi.org/10.1002/cne.903360210>
98. **Yoest K. E.**, Cummings J. A. & Becker J. B. (2014). Estradiol, dopamine and motivation. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 14(2),83–89. <https://doi.org/10.2174/1871524914666141226103135>
99. **Yoest K.E.**, Quigley J.A. & Becker J.B. (2018). Rapid effects of ovarian hormones in dorsal striatum and nucleus accumbens. *Hormones And Behavior*, 104, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.002>
100. **Zimmerman M. A.**, Budish R. A., Kashyap S., & Lindsey, S. H. (2016). GPER-novel membrane oestrogen receptor. *Clinical science (London, England: 1979)*, 130(12), 1005–1016. <https://doi.org/10.1042/CS20160114>