





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

EFFECTOS DE LA ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE ALLOPREGNANOLONA DURANTE PERIODOS CRÍTICOS DEL NEURODESARROLLO EN LA VULNERABILIDAD AL CONSUMO DE ALCOHOL

Tesis Doctoral presentada por

Iris Bartolomé Torrell

Dirigida por

Dr. Marc Pallarès

Dra. Sònia Darbra

para optar al grado de doctor en Neurociencias del programa de doctorado en
Neurociencias de la Universidad Autònoma de Barcelona

Grupo Neuroesteroides y Conducta, Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias de la Salud

Instituto de Neurociencias, Universidad Autònoma de Barcelona



Septiembre 2018

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

La investigación en esta tesis se realizó en el departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias de la Salud, Instituto de Neurociencia de la Universitat Autònoma de Barcelona, en el grupo de Neurosteroides y Comportamiento.

Este trabajo fue apoyado por una subvención del Ministerio de Economía y Competitividad de España (PSI2012-36646 y PSI2015-66582-P).

Índice

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	9
1. ¿Qué son los NAS?	10
1.1. Biosíntesis de los NAS	12
1.2. Mecanismos de acción de los NAS	15
2. Los NAS durante el neurodesarrollo	18
2.1. Alteraciones de los niveles de NAS durante el neurodesarrollo: Efectos conductuales	23
3. Diferencias individuales y vulnerabilidad al consumo de drogas	28
4. Las interacciones entre los NAS y el EtOH	33
5. Papel de los NAS en la vulnerabilidad al consumo de EtOH	37
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	43
EXPERIMENTO 1	45
MÉTODOS	47
RESULTADOS	51
Effects of neonatal and adolescent neuroactive steroid manipulation on locomotor activity induced by ethanol in male Wistar rats	51
EXPERIMENTO 2	69
MÉTODOS	71
Protocolo de Western Blot	73
EXPERIMENTO 2a. RESULTADOS	77
Early postnatal neuroactive steroid manipulation modulates ondansetron effects on initial periods of alcohol consumption in rats	77
EXPERIMENTO 2b. Resultados	99
1. Expresión del receptor 5-HT3 durante la etapa postnatal temprana	99
2. Expresión del receptor 5-HT3 en edad adulta	101
RESUMEN DE LOS RESULTADOS	103
DISCUSIÓN	107
Ateración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal y adolescencia tempranas: Efectos sobre la conducta emocional	107
Ateración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal y adolescencia tempranas: Sensibilidad a los efectos estimulantes de una dosis baja de EtOH	109

Ateración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal temprana: Preferencia por la novedad	111
Ateración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal temprana en el consumo inicial de EtOH: Implicación del receptor 5-HT3.....	112
Discusión general: La participación de los NAS durante las etapas postnatal y adolescente tempranas en la vulnerabilidad al consumo de EtOH.....	118
CONCLUSIONES.....	125
REFERENCIAS	127
ANEXO	155
<i>Póster: Neonatal allopregnanolone manipulation affects sensitivity to stimulating effects of alcohol in adulthood: possible role in drug abuse vulnerability.....</i>	155
<i>Póster: Neonatal neurosteroids levels alteration on alcohol abuse vulnerability: participation of serotonin 5-HT3 receptors</i>	157

ABREVIATURAS

5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT1A: Receptor de la serotonina de tipo 1A

5-HT1B: Receptor de la serotonina de tipo 1B

5-HT2A: Receptor de la serotonina de tipo 2A

5-HT2C: Receptor de la serotonina de tipo 2C

5-HT3: Receptor de la serotonina tipo 3

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

AMPA: Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico del glutamato

ATV: Área tegmental ventral

BSA: Albúmina sérica bovina

Cl: Cloruro

CORT: Corticoesterona

CPP: Condicionamiento de preferencia por un lugar

D2: receptor tipo 2 de la dopamina

D4: receptor tipo 4 de la dopamina

D4-KO: ratones knock-out para el gen DRD4

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHEAS: Sulfato de dehidroepiandrosterona

DOC: Deoxicorticosterona

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

EPM: laberinto en cruz elevado

EtOH: Alcohol

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GABAA: Receptores de subtipo A para el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico

HRs: Ratas que responden con altos niveles de locomoción en un ambiente nuevo

i.c.v.: Intracerebroventricular

IMM: Membrana interna de la mitocondria

i.p.: Intraperitoneal

KCC2: Cotransportador de potasio-cloruro tipo 2

L-DOPA: L-3,4-dihidrofenilalanina

LRs: Ratas que responden con bajos niveles de locomoción en un ambiente nuevo

NAS: Esteroides neuroactivos

NH: No manipulados

NKCC1: Cotransportador de sodio-potasio-cloruro de tipo 1

NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato del glutamato

NOP: Preferencia por un objeto nuevo

OF: Campo abierto

OMM: Membrana externa de la mitocondria

P450scc: Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol

PN: Postnatal

PPI: Inhibición prepulso

PREGS: Sulfato de pregnenolona

PROG: Progesterona

RHA: Ratas roman de alta evitación

RLA: Ratas roman de baja evitación

s.c.: Subcutáneo

SHRP: Período de hiporeactividad al estrés

SNC: Sistema nervioso central

StAR: Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis

THDOC: Tetrahydrodeoxicorticosterona

TSPO: proteína translocadora

INTRODUCCIÓN

Está bien establecido que los esteroides sexuales, como los estrógenos o los andrógenos, desempeñan papeles críticos en el cerebro, tanto durante el desarrollo como a lo largo de la vida adulta. Forman y organizan el sistema nervioso central (SNC) durante el desarrollo e influyen en la función del cerebro y una gran variedad de comportamientos (Brunton et al., 2014).

La plasticidad durante el neurodesarrollo es un complejo proceso de maduración codificado genéticamente, dependiente del tiempo y que está estrechamente regulado por mecanismos homeostáticos intrínsecos e influenciado por experiencias ambientales extrínsecas (Ismail et al., 2017). Ha sido puesto de manifiesto que experimentar eventos adversos durante etapas críticas del neurodesarrollo aumenta la vulnerabilidad a la psicopatología. Por ejemplo, aquellos sujetos que sufren maltrato o negligencia infantil tienen más riesgo a padecer depresión mayor (Bradley et al., 2008), consumir drogas, como el alcohol (EtOH) (Enoch, 2011), o sufrir un trastorno por estrés posttraumático (Binder et al., 2008). Durante la adolescencia, el consumo de cannabis puede alterar el efecto de la expresión de genes implicados en la plasticidad (Prini et al., 2018), así como aumentar el riesgo de experimentar experiencias psicóticas en la adultez (Rosenberg, 1968; Jones et al., 2018). Por lo tanto, la influencia ejercida por el ambiente durante periodos clave, como la primera infancia o la adolescencia, puede producir cambios a nivel madurativo que se mantendrán a largo plazo.

Los modelos animales permiten investigar cómo o por qué se manifiestan diversos comportamientos, tanto normales como patológicos, pudiendo aislar

factores concretos que, en parte, estarían originando las distintas conductas. Nuestro grupo investiga cómo los esteroides neuroactivos (NAS; por *Neuroactive Steroid*), entre ellos la allopregnanolona, influyen en la conducta adulta a través de su participación en el neurodesarrollo. Este trabajo trata de aportar más información sobre cómo los niveles de NAS en etapas cruciales del neurodesarrollo podrían desempeñar un papel importante en la vulnerabilidad al consumo de drogas como el alcohol.

En los siguientes apartados se expondrá el marco referencial de este trabajo, poniendo énfasis en la participación de los niveles de NAS durante el neurodesarrollo y cómo su alteración puede modificar el comportamiento adulto. Se revisarán algunas de las diferencias individuales a nivel conductual que han sido vinculadas con la vulnerabilidad al consumo de drogas. Para finalizar, se justificarán los objetivos de este trabajo describiendo cómo los niveles de NAS durante el neurodesarrollo podrían estar participando en la posible vulnerabilidad al consumo de EtOH en edad adulta.

1. ¿Qué son los NAS?

Los esteroides son sustancias sintetizadas a nivel periférico en las gónadas (testículos y ovarios) y la corteza adrenal, que tradicionalmente fueron conocidos por su función hormonal. No fue hasta finales de los años 60 del siglo XX cuando se describió su efecto genómico a través de la interacción con receptores intracelulares (Balthazart et al., 2018). Una década más tarde, se puso de manifiesto que la membrana de células endometriales presentaba lugares de

unión de alta afinidad para esteroides como los estrógenos (Pietras y Szego, 1977) y posteriormente también fueron identificados en membranas sinaptosomales en cerebro de rata adulta (Towle y Sze, 1983). Majewska y sus colaboradores (1986) observaron cómo los metabolitos del esteroide progesterona (PROG), allopregnanolona y deoxicorticosterona (DOC), podían alterar rápidamente la excitabilidad neuronal a través de los receptores de subtipo A para el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABAA), explicando así las acciones anestésicas e hipnóticas parecidas a las de los barbitúricos que se le habían atribuido a la PROG años atrás. También en la década de los 80, el grupo de Baulieu introdujo el término neuroesteroide tras observar que los niveles en el cerebro de rata de la forma sulfatada del esteroide dehidroepiandrosterona (DHEAS) no disminuían 15 días después de realizar una gonadectomía y adrenalectomía en roedores (Corpéchet et al., 1981). Esto indicaba que el SNC también podía actuar como un órgano esteroideogénico, ya que los esteroides estaban siendo sintetizados *de novo* en el tejido nervioso independientemente de las fuentes periféricas. Teniendo en cuenta que los esteroides sintetizados periféricamente también son capaces de penetrar en el sistema nervioso y modular las funciones nerviosas, ya que logran cruzar la barrera hematoencefálica, Paul y Purdy (1992) introdujeron el término esteroides neuroactivos para referirse a todos aquellos esteroides que son capaces de regular la excitabilidad neuronal independientemente de su origen (para un resumen histórico más detallado sobre la evolución del conocimiento de los esteroides y sus mecanismos de acción ver Simoncini y Genazzani, 2003; Balthazart, 2017; Balthazart et al., 2018).

1.1. Biosíntesis de los NAS

El colesterol es el único precursor de los esteroides (Rone et al., 2009). La esteroidogénesis se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria (IMM; por *Inner Mitochondrial Membrane*) la cual es relativamente pobre en colesterol, ya que la mayoría se segrega desde la membrana externa mitocondrial (OMM; por *Outer Mitochondrial Membrane*) (Rone et al., 2009; Miller y Bose, 2011; Papadopoulos y Miller, 2012). El principal mecanismo de acción que transporta el colesterol de la OMM a la IMM viene mediado por varias proteínas. Entre ellas se encuentran la proteína translocadora (TSPO), anteriormente conocida como receptor de benzodiazepina de tipo periférico (Papadopoulos et al., 2006), la cual tiene una alta afinidad por el colesterol y es capaz de translocarlo a la IMM, y la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR), además de otras como el canal de aniones dependiente de voltaje, el transportador de nucleótidos de adenina o la proteína transportadora de fosfato. Estas proteínas interactúan entre ellas para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial (Rone et al., 2009; Miller y Bose, 2011; Papadopoulos y Miller, 2012; Porcu et al., 2016). Después de observar que ratones de tipo knockout para la TSPO pueden seguir sintetizando esteroides (Banati et al., 2014; Morohaku et al., 2014; Tu et al., 2014), algunos investigadores han afirmado que la TSPO no es esencial para la esteroidogénesis (Miller, 2017; Stocco et al., 2017). Sin embargo, recientemente, Barron y colaboradores (2018) han puesto de manifiesto que la deficiencia de TSPO da como resultado una producción total de esteroides reducida y estas anomalías se agravan con el envejecimiento. Estos autores han observado que la TSPO es fundamental para mantener la

producción de andrógenos, apoyando la noción de que esta proteína puede representar un objetivo terapéutico para el tratamiento del hipogonadismo y la deficiencia de andrógenos relacionada con la edad.

Una vez el colesterol ha sido transportado a la IMM, éste se convierte en pregnenolona por la acción de la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) (Rone et al., 2009; Miller y Bose, 2011; Papadopoulos y Miller, 2012). Si bien existen evidencias de que la pregnenolona también puede ejercer una acción directa sobre el sistema nervioso (Vallée et al., 2014), durante mucho tiempo ha sido considerada como el precursor inactivo de todas las hormonas esteroidales, ya que es rápidamente metabolizada mediante varias enzimas que se encuentran en el interior de la célula. Por ejemplo, en presencia de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la pregnenolona es metabolizada en PROG. A su vez, la PROG puede ser reducida por la enzima 5 α -reductasa dando lugar a la 5 α -dihidroprogesterona, la cual puede ser metabolizada en 3 α , 5 α -tetrahidroprogesterona, comúnmente conocida como allopregnanolona, mediante la enzima 3 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Mellon y Griffin, 2002; Belelli y Lambert, 2005) (ver figura 1).

Los NAS pueden ser clasificados según su composición química. Su estructura consta de un núcleo de esterano y se diferencian en base al número total de carbonos que los conforman: (1) de tipo pregnano (21 carbonos), que consisten en la pregnenolona, la PROG y sus derivados, como la allopregnanolona, la epiallopregnanolona, la pregnanolona, la DOC o la tetrahydrodeoxicorticosterona (THDOC); (2) de tipo androstano (19 carbonos), incluyendo la dehidroepiandrosterona (DHEA), la dihidrotestosterona, la testosterona, la androsterona, el andostranediol o la etriocolanolona; y por

último, (3) de tipo sulfatado, los cuales han sido sometidos a un proceso de sulfatación, como el DHEAS o el sulfato de pregnenolona (PREGS) (Le Mellédo y Baker, 2002; Carta et al., 2012; Tuem y Atey, 2017).

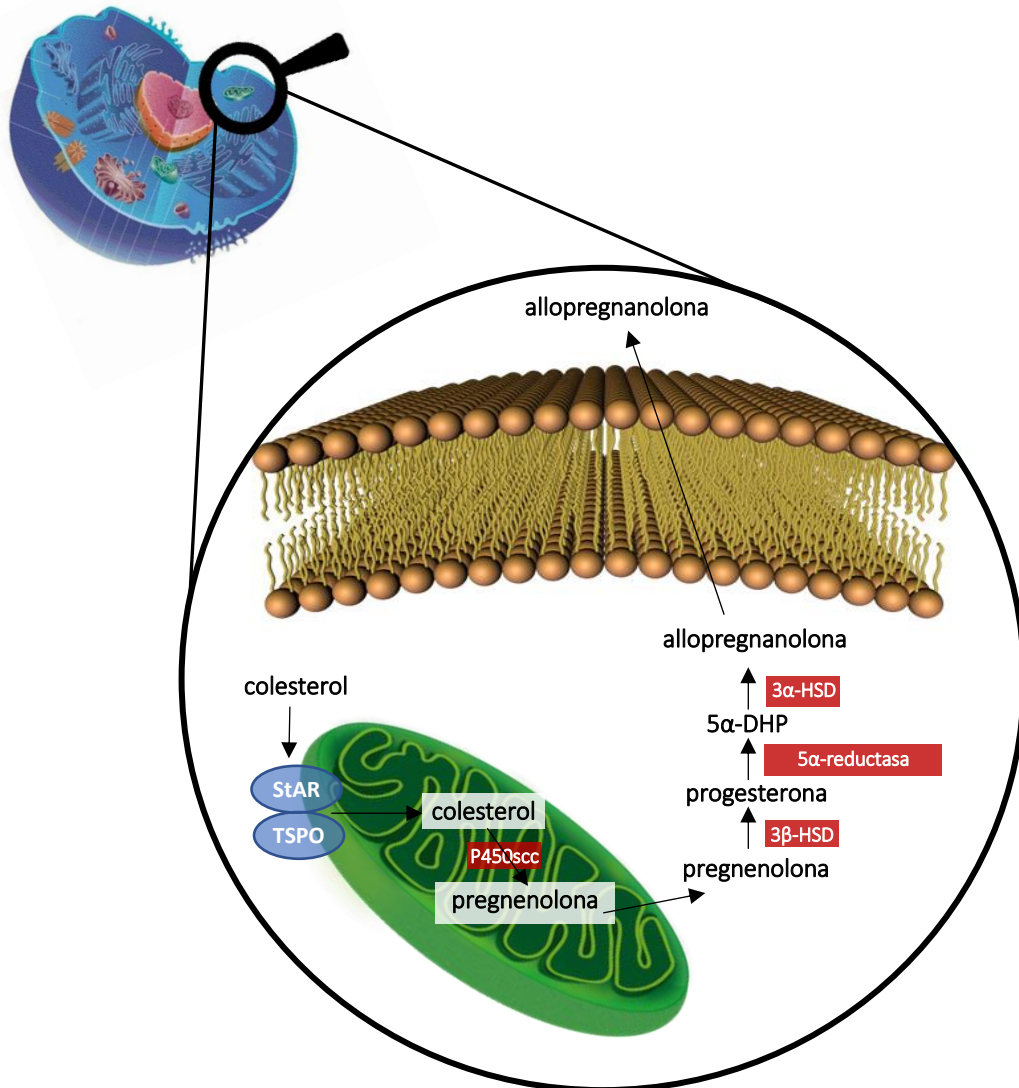


Figura 1. Biosíntesis de la allopregnanolona. Se muestra como el colesterol se convierte en pregnenolona y la consiguiente transformación hasta allopregnanolona. Abreviaturas: proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis, StAR; proteína translocadora, TSPO; enzima P450 de escisión de la cadena lateral del colesterol, P450scc; 3β/3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa, 3β-HSD/3α-HSD; 5α-dihidroprogesterona, 5α-DHP. Para una mayor explicación ver el texto que la acompaña.

Desde que Baulieu y sus colaboradores (1981) pusieron de manifiesto que el cerebro actuaba como un órgano esteroidogénico, se ha realizado un gran

número de investigaciones con el fin de localizar las enzimas esteroideogénicas en el sistema nervioso. Estas enzimas se expresan en células gliales, tanto en células de Schwann como en oligodendrocitos y astrocitos (Baulieu, 1998; Do Rego et al., 2009), y también en neuronas (Agís-Balboa et al., 2006; Chisari et al., 2010; Pelletier, 2010). Se encuentran ampliamente distribuidas por todo el cerebro, con algunas variaciones según la especie animal (Pelletier, 2010). La enzima 5 α -reductasa se encuentra de manera muy abundante en el cerebro de rata, ratón y humano (Melcangi et al., 1998; Torres y Ortega, 2003a; Steckelbroeck et al., 2001; Pelletier, 2010), y ha sido localizada en células GABAérgicas de la formación reticular del tálamo, en el cuerpo estriado y en células de Purkinje cerebelares, además de en células glutamatérgicas del giro dentado del hipocampo, en el tálamo, amígdala, y en neuronas piramidales de la corteza cerebral (Agís-Balboa et al., 2006). Se ha descrito que las neuronas glutamatérgicas son una de las principales fuentes para la síntesis de los neuroesteroides (Chisari et al., 2010).

1.2. Mecanismos de acción de los NAS

Como ya se ha explicado anteriormente, los esteroides pueden actuar a nivel genómico causando un efecto lento que puede mantenerse a largo plazo a través de la unión a receptores intracelulares, ya que estas sustancias son capaces de traspasar la membrana celular debido a que son muy liposolubles (Viero y Dayanithi, 2008). Al actuar sobre receptores nucleares, como el receptor de la progesterona o el receptor xenobiótico de pregnano, los esteroides pueden participar en los cambios en la transcripción génica, mediando en la biosíntesis

proteica, así como en la propia esteroidogénesis (Yamamoto, 1985; Magnaghi et al., 2001; Frye et al., 2011a).

Los esteroides también pueden actuar sobre los receptores de membrana y canales iónicos (Rupprecht et al., 1993; Rupprecht y Holsboer, 1999; Le Mellédo y Baker, 2002; Rupprecht, 2003) (ver Tabla 1). Su principal acción como NAS es la de modular alostéricamente los receptores ionotrópicos (Majewska et al., 1986; Rupprecht y Holsboer, 1999; Reddy, 2003). Por ejemplo, los NAS 3α -reducidos derivados de la PROG actúan como potentes moduladores alostéricos positivos de los receptores GABAA, aumentando la frecuencia y duración de apertura del canal de cloruro (Cl^-) que genera la hiperpolarización de la neurona (Lambert et al., 1995; Belelli y Lambert, 2005). A nivel conductual, esta acción provoca un efecto ansiolítico, anticonvulsivo y sedativo similar al de las benzodiazepinas (Belelli et al., 1989; Frye, 1995; Smith, 2002). En cambio, el DHEAS y el PREGS se comportan como moduladores alostéricos negativos del receptor GABAA, reduciendo la frecuencia de apertura del canal de Cl^- e inhibiendo así su afluencia (Gee, 1988; Mienville y Vicini, 1989). Debido a esto, el DHEAS y el PREGS presentan un perfil proconvulsionante (Reddy y Kulkarni, 1998; Williamson et al., 2004), y ansiogénico (Melchior y Ritzmann, 1994). Tanto el DHEAS como el PREGS actúan como facilitadores de la memoria y potenciadores cognitivos (Vallée et al., 1997; Pallarés et al., 1998; Mayo et al., 2003) ya que también son moduladores positivos del receptor N-metil-D-aspartato del glutamato (NMDA) (Kussius et al., 2009; Smith et al., 2014).

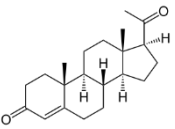
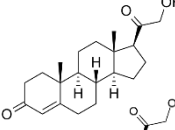
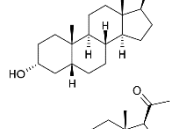
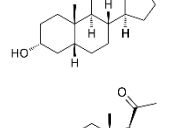
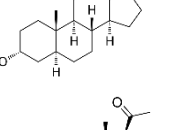
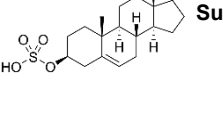
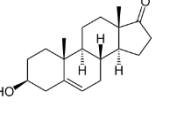
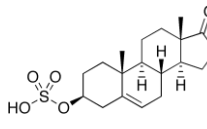
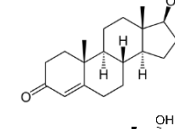
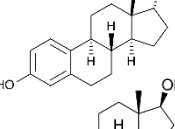
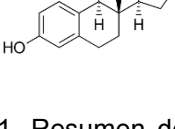
Esteroido	Receptor	Tipo de Modulación	Fuente
 Progesterona	Glicina 5-HT3 Nicotínico Sigma-1	Negativa Negativa Negativa Negativa	Wu et al, 1990 Wetzel et al 1998 Valera et al., 1992 Zou et al, 2000
 DOC	GABAA	Positiva	Majewska et al 1986
 THDOC	GABAA	Positiva	Kokate et al 1994
 Pregnanolona	GABAA Glicina	Positiva Positiva	Landgren, 1991 Weir et al, 2004
 Allopregnanolona	GABAA 5-HT3 Nicotínico	Positiva Negativa Negativa	Majewska et al 1986 Wetzel et al 1998 Bullock et al, 1997
 Sulfato de pregnenolona	GABAA NMDA AMPA Kainato Glicina	Negativa Positiva Negativa Negativa Negativa	Majewska et al, 1988 Weaver et al., 1998 Yaghoubi et al, 1998 Yaghoubi et al, 1998 Fodor et al., 2006
 DHEA	GABAA NMDA Sigma-1	Negativa Positiva Positiva	Imamura y Prasad, 1998 Bergeron et al, 1996 Maurice et al, 1997
 DHEAS	GABAA Glicina Sigma-1	Negativa Negativa Positiva	Imamura y Prasad, 1998 Fodor et al., 2006 Yoon et al., 2009
 Testosterona	5-HT3 Sigma-1	Negativa Negativa	Wetzel, 1998 Waterhouse et al., 2007
 17α-Estradiol	5-HT3	Negativa	Wetzel, 1998
 17β-Estradiol	NMDA 5-HT3	Negativa Negativa	Weaver et al, 1997 Wetzel et al 1998

Tabla 1. Resumen de los efectos moduladores de los NAS en los diferentes receptores de membrana. Abreviaturas: 5-HT3, receptor de la 5-hidroxitriptamina tipo 3; GABAA, receptor del ácido gamma-aminobutírico tipo A; NMDA, receptor N-metil-D-aspartato del glutamato; AMPA, receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico del glutamato; 3 α -DHP, 3 α -dihidroprogesterona; DOC, dihidrodeoxicorticosterona; THDOC, tetrahidrodeoxicorticosterona; DEAH, dihidroepiandrosterona; DEAS, sulfato de dihidroepiandrosterona.

2. Los NAS durante el neurodesarrollo

Los NAS han sido vinculados tanto en procesos de neurodesarrollo (Grobin y Morrow, 2001; Mellon, 2007) como en procesos de homeostasis (Frye et al., 2011b; Brunton et al., 2014; Purdy et al., 1991). Ya que sus niveles oscilan a lo largo de la vida, estas fluctuaciones han sido relacionada con diversas condiciones fisiológicas, como el ciclo menstrual (Rapkin et al., 1997; Monteleone et al., 2000), el estrés (Serra et al., 2000), el embarazo (Concas et al., 1998) o el propio envejecimiento (Bernardi et al., 1998).

El cerebro en etapa fetal ya actúa como un órgano esteroidogénico (Pomata et al., 2000) y presenta niveles de NAS similares a los del cerebro adulto (Kellogg et al., 2006). Los niveles de allopregnanolona fluctúan durante el neurodesarrollo, siendo más elevados en tejido nervioso fetal durante la gestación tardía (Kellogg y Frye, 1999; Grobin y Morrow; 2001). Según Hirst y sus colaboradores (2016), los altos niveles fetales de allopregnanolona durante la gestación tardía jugarían un rol primordial en la regulación de la actividad del SNC fetal. Además, los eventos estresantes durante el embarazo estimulan la liberación de allopregnanolona, así que este NAS podría estar ejerciendo un papel neuroprotector durante la gestación (Brunton et al., 2014; Hirst et al., 2014).

Grobin y Morrow (2001) también analizaron los niveles de allopregnanolona de la corteza cerebral en ratas desde el día del nacimiento (PN0) hasta el día de destete (PN21). De manera relevante, observaron un pico en los niveles de allopregnanolona entre PN10-PN14 (ver figura 2). La etapa

postnatal temprana (PN2-PN14)¹ es conocida como el período de hiporeactividad al estrés (SHRP; por *Stress Hypo-Responsive Period*) y representa una fase de alta plasticidad dentro del SNC con migración neuronal, sinaptogénesis y apoptosis (Gunn et al., 2015). Durante este periodo, los animales presentan bajos niveles de corticoesterona (CORT) y de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en respuesta al estrés (Sapolsky y Meaney, 1986; Rosenfeld et al., 1992), lo cual refleja la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal que aún está en desarrollo (Ellenbroek y Cools, 2002). La hipoactividad de este eje en respuesta al estrés es clave durante la vida temprana ya que protege al sistema nervioso en desarrollo de eventos estresantes (Brunton et al., 2014). Si un estresor es capaz de elevar los niveles de CORT y ACTH durante el SHRP, puede causar múltiples alteraciones en el neurodesarrollo (Bock et al., 2014; Chen y Baram, 2016) como por ejemplo, una reducción en la densidad de interneuronas GABAérgicas en la corteza prefrontal medial y el hipocampo (Fride et al., 1986; Barros et al., 2006), lo que ha sido vinculado a varios trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia, el autismo o la ansiedad (Fine et al., 2014).

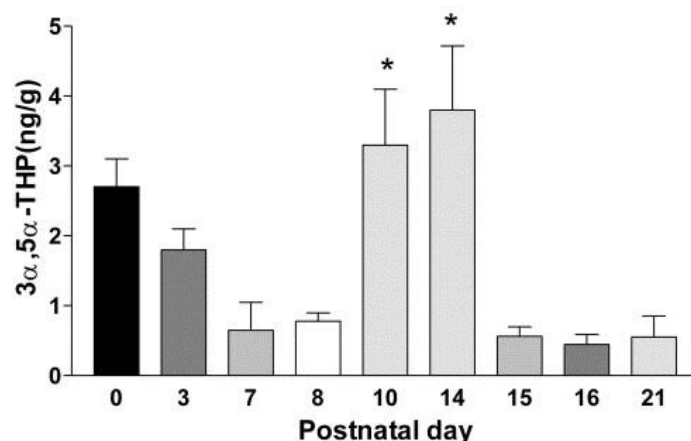


Figura 2. Los niveles de allopregnanolona muestran una elevación durante el período postnatal temprano de rata (Extraído de Grobin y Morrow, 2001).

¹ En términos de maduración cerebral, se ha sugerido que los días postnatales del 2 al 7 (PN2-7) en rata corresponderían al tercer trimestre de gestación en humano, y PN12-13 en rata equivaldrían al día de nacimiento en humano (Romijn et al., 1991; Clancy et al., 2007).

El receptor GABA_A desempeña un papel importante durante el desarrollo. A diferencia del cerebro adulto, durante el neurodesarrollo temprano, el ácido gamma-aminobutírico (GABA) presenta un perfil despolarizante haciendo que la activación del GABA_A desencadene la salida de Cl⁻ (Ben-Ari et al., 2007; Ben-Ari et al., 2012). La despolarización inducida por el GABA provoca la eliminación del bloqueo dependiente de voltaje ejercido por el magnesio en los receptores-canal NMDA, lo que generará una gran entrada de calcio y activará diversos mecanismos neurotróficos que mediarán en procesos de proliferación, migración y diferenciación neuronales (ver Owens y Kriegstein, 2002). El perfil despolarizante del GABA viene promovido por la mayor concentración de Cl⁻ intracelular que contienen las neuronas inmaduras, ya que el cotransportador de sodio-potasio-cloruro de tipo 1 (NKCC1), que transporta el Cl⁻ dentro de la célula, se encuentra mucho más expresado que el cotransportador de potasio-cloruro KCC2 (el cual extrae el Cl⁻ hacia fuera de la célula) causando así la acumulación intracelular de este anión (ver figura 3). Por el contrario, en cerebro adulto se observa un aumento de la expresión del KCC2 en detrimento del NKCC1, proporcionando el perfil hiperpolarizante del sistema GABAérgico (Ben-Ari et al., 2007; Ben-Ari et al., 2012).

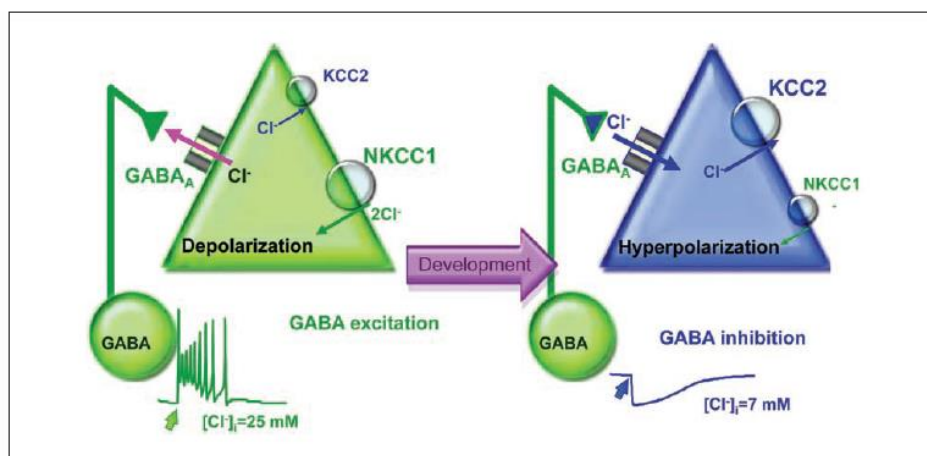


Figura 3. El cambio de polaridad GABAérgica está determinado, en parte, por la expresión diferencial durante el desarrollo de dos de los cotransportadores principales de cloruro: NKCC1 y KCC2. (Extraído de Ben-Ari et al., 2012).

El cambio en la respuesta del receptor GABAA depende de la edad del sujeto y del sexo, además de la zona del cerebro (Ben-Ari et al., 2007). Se ha observado en modelos animales, que este cambio en la polaridad GABAérgica se daría a partir de la segunda semana postnatal (PN8-PN10) en diversas estructuras como el estriado, la médula espinal (Dehorter et al., 2011; Dehorter et al., 2012) o el hipocampo (Sipilä et al., 2006), pudiendo coincidir temporalmente con el aumento de los niveles de allopregnanolona durante PN10.

Otro neurotransmisor que ha ido ganando atención es la serotonina. Este neurotransmisor es uno de los primeros que aparece durante el desarrollo de roedor (Lauder, 1990; Pfaar et al., 2002), y ejerce una función clave como regulador tanto a nivel pre como postnatal temprano en el SNC (Engel et al., 2013):

- Ayuda a establecer la organización del SNC en la formación de circuitos (Vitalis et al., 2007; Daubert y Condron, 2010).
- Está involucrada tanto en la división, como en la diferenciación y la migración neuronales (Dooley et al., 1997; Lavdas et al., 1997; Azmitia, 2001; Vitalis et al., 2007).
- Regula la formación de dendritas (Vitalis et al., 2007) y la sinaptogénesis de las neuronas corticales (Chubakov et al., 1986; Matsukawa et al., 2003).

Ha sido puesto de manifiesto que varios receptores para la serotonina se expresan en el cerebro en desarrollo, incluido un canal iónico controlado por ligando, el receptor de la serotonina tipo 3 (5-HT3) (Engel et al., 2013). De manera especial, se ha observado que los receptores 5-HT3 se expresan en las

interneuronas GABAérgicas inmaduras embrionarias localizadas en la parte caudal del estriado (Lee et al., 2010; Vucurovic et al., 2010), así como en los neuroblastos postnatales tempranos que migran a través de la zona subventricular neocortical (Inta et al., 2008; Tanaka y Nakajima, 2012). Por lo tanto, como los receptores 5-HT₃ se expresan en células que son cruciales para controlar funciones fisiológicas (interneuronas GABAérgicas) tanto en el neocortex como en el sistema límbico (Engel et al., 2013), estos receptores podrían estar involucrados en la regulación de la excitabilidad neuronal y en la migración, maduración y formación de redes inhibitorias desde etapas embrionarias tempranas.

Durante la adolescencia, las fluctuaciones de NAS como la PROG, los androstanos y el estradiol han sido asociadas a la maduración del sistema nervioso (Smith et al., 2009). Diversos estudios sugieren que los niveles de allopregnanolona aumentan durante el periodo prepuberal en rata y ratón, y disminuyen al inicio de la pubertad (Smith et al., 2007), exhibiendo, a partir de entonces, fluctuaciones que siguen un ritmo circadiano (Corpéchet et al., 1997). En roedores hembra, se observa un pico en los niveles de PROG y estradiol inmediatamente antes del inicio de la pubertad (Safranski et al., 1993; Apter y Hermanson, 2002; Kahn et al., 2008), seguidamente estos niveles disminuyen (Kahn et al., 2008; Shen et al., 2007) hasta que empieza la ciclicidad ovárica, con la consiguiente ciclicidad de los niveles de NAS (revisado en Smith, 2013). Estudios realizados en humanos han puesto de manifiesto que los niveles circulantes de allopregnanolona también son relativamente bajos en las primeras fases de la adolescencia en mujeres (Fadalti et al., 1999; Smith et al., 2007). Se ha observado que estos niveles aumentan progresivamente durante el desarrollo

puberal junto con otros NAS, como la DHEA, el DHEAS y la PROG, tanto en mujeres como en hombres (Hopper y Yen, 1975; Fadalti et al., 1999; Iughetti et al., 2002; Iughetti et al., 2005).

El inicio de la pubertad se ha asociado con la regulación al alza de las subunidades $\alpha 4\beta\delta$ del receptor GABAA a lo largo de las dendritas apicales de las células piramidales del hipocampo (Smith et al., 2009). Se ha observado en roedores hembra que la allopregnanolona inhibe el receptor GABAA que contiene estas subunidades (Hsu y Smith, 2003). Dado que este receptor ya presenta un flujo de Cl^- hacia dentro de la célula, como ocurre en el hipocampo maduro, la modulación ejercida por la allopregnanolona provoca una disminución de la corriente inhibitoria tónica GABAérgica en la pubertad, lo que conduce a una mayor excitabilidad neuronal y aumenta la ansiedad a nivel conductual (Smith et al., 2009). Estos hallazgos sugieren que la allopregnanolona podría ejercer un importante papel en los cambios de humor (Buchanan et al., 1992; Hayward y Sanborn, 2002) y la susceptibilidad al estrés (Susman et al., 1988; Modesti et al., 2006) que se asocian a la etapa adolescente.

2.1. Alteraciones de los niveles de NAS durante el neurodesarrollo: Efectos conductuales

Como se ha comentado en el apartado anterior, los NAS pueden jugar un papel importante en la regulación del neurodesarrollo temprano. Así, cuando se alteran los niveles endógenos de NAS, por ejemplo, a través de la administración neonatal de allopregnanolona se observa una modificación del número y

localización de interneuronas GABAérgicas en el córtex prefrontal adulto (Grobin et al., 2003), además de una disminución del número total de neuronas en el núcleo dorsomedial del tálamo (Gizerian et al., 2004) y una disminución de los niveles basales de dopamina estriatal (Muneoka et al., 2009). La administración neonatal de PROG, precursor de la allopregnanolona, también induce la disminución de los niveles basales de dopamina, junto con una disminución de los niveles de serotonina en el estriado (Muneoka et al., 2010). Además, ha sido documentado que el tratamiento neonatal con estradiol, el cual induce una disminución persistente en las concentraciones cerebrales y plasmáticas de PROG y allopregnanolona (McCarthy, 2008; Berretti et al., 2014; Calza et al., 2010), aumenta la producción de dopamina extracelular en el cortex prefrontal medial, efecto que puede ser revertido mediante el posterior tratamiento con PROG (Porcu et al., 2017). Por otro lado, la administración neonatal de un inhibidor de la enzima 5 α -reductasa, finasteride (Mukai et al., 2008), el cual se ha observado que tiende a aumentar los niveles de allopregnanolona en el hipocampo neonatal (Mòdol et al., 2013; Darbra et al., 2014), provoca un aumento en la expresión de las subunidades $\alpha 4\delta$ del receptor GABAA en esta misma estructura (Modol et al., 2014). Este conjunto de datos pone de manifiesto la importancia de los niveles basales de NAS durante el neurodesarrollo temprano ya que su manipulación altera la maduración de diversas estructuras cerebrales.

A nivel conductual se ha observado que la manipulación de los niveles neonatales de NAS puede modificar el comportamiento. Se ha puesto de manifiesto que la administración de allopregnanolona durante la etapa postnatal temprana en ratas provoca la disminución de respuestas relacionadas con la

ansiedad en el laberinto en cruz elevado (EPM; por *Elevated Plus Maze*), ya que los animales adultos pasan más tiempo y hacen más entradas en los brazos abiertos del aparato sin mostrar diferencias en la actividad locomotriz (Zimmerberg y Kajunski, 2004; Darbra y Pallarès, 2012). También ha sido puesto de manifiesto que la administración neonatal de allopregnanolona provoca una disminución de los efectos ansiolíticos del lorazepam en el EPM, sugiriendo que un aumento de los niveles neonatales de este NAS podría disminuir la sensibilidad a los efectos de esta benzodiazepina (Darbra y Pallarès, 2009). Por otro lado, se ha observado que la administración neonatal de finasteride provoca una disminución del tiempo y número de entradas en los brazos abiertos del EPM en animales que han sido sometidos a cirugía estereotáxica (Martín-García et al. 2008).

Por lo que hace referencia a la conducta inducida por la novedad, en nuestro laboratorio hemos observado que el tratamiento neonatal con finasteride puede provocar una disminución de la exploración en el test de Boissier durante la adolescencia (Darbra y Pallarès, 2010). En cambio, una única administración de allopregnanolona en etapa postnatal temprana puede provocar un aumento de la conducta exploratoria inducida por un ambiente nuevo en un campo abierto (OF; por *Open Field*) en edad adulta (Darbra y Pallarès 2009). Al respecto de la actividad locomotriz, otros estudios han mostrado que la administración neonatal de allopregnanolona provoca un aumento de la actividad inducida por la anfetamina (Gizerian et al., 2006), sugiriendo que esta manipulación durante el periodo postnatal temprano aumentaría la sensibilidad a los efectos estimulantes de la anfetamina.

Nuestro grupo también ha realizado estudios sobre la inhibición prepulso (PPI; por *Prepulse Inhibition*). Ésta es una prueba preatencional en la que se presenta un estímulo débil (prepulso), que precede a un estímulo más fuerte (pulso) el cual provoca una reacción de sobresalto. En condiciones normales el prepulso produce una atenuación del reflejo de la respuesta de sobresalto provocada por el pulso. Se ha observado una disminución de la PPI en edad adulta provocada por la administración neonatal de allopregnanolona tanto si es inyectada de forma aguda (Gizerian et al., 2006), como durante varios días consecutivos (Darbra y Pallarès, 2010; Llidó et al., 2013). La alteración de la PPI ha sido vinculada con una afectación en el sistema dopaminérgico y GABAérgico mesocortical y del córtex prefrontal (Swerdlow et al., 2001; Gizerian et al., 2006) además del hipocampo dorsal y ventral (Zhang et al., 2002). Así, los resultados conductuales obtenidos en la prueba de PPI van en consonancia con algunas de las alteraciones estructurales observadas tras la manipulación de los niveles de NAS neonatales (Grobin et al., 2003).

Otros estudios se han centrado en observar los efectos conductuales en situaciones adversas como el estrés, tras la manipulación de los niveles de NAS neonatales. El estrés agudo aumenta las concentraciones cerebrales y plasmáticas de allopregnanolona en roedores (Purdy et al., 1991; Barbaccia et al., 1996; Barbaccia et al., 1997; Cozzoli et al., 2014), así como los niveles circulantes en humanos (Droogleever Fortuyn et al., 2004). De manera especial, en nuestro laboratorio hemos observado que las ratas sometidas a natación forzada presentan un aumento de los niveles de allopregnanolona en plasma, los cuales no se observan si se administra previamente finsateride (Pallarès et al., 2015). Una manera de mimetizar el aumento de los niveles de

allopregnanolona que se observa tras un estrés agudo es a través de la administración de su precursor, la PROG (Moran y Smith, 1998; Pisu et al., 2016). Nuestro grupo ha documentado que la administración de PROG durante la adultez provoca un aumento de un perfil ansiogénico en el EPM en aquellos animales tratados neonatalmente con finasteride (Modol et al., 2014). Por lo tanto, la alteración de los niveles neonatales de NAS mediante la inhibición de la enzima 5 α -reductasa podría estar modificando la sensibilidad a los efectos ansiolíticos provocados por la administración de este precursor de la ALLO. Por otro lado, los animales sometidos a estrés por separación materna exhiben una menor exploración en la prueba de Boissier durante la adolescencia, efectos que son neutralizados por la administración neonatal de allopregnanolona previa a la separación (Llidó et al., 2013).

En resumen, son varias las evidencias que ponen de manifiesto que la manipulación de los niveles neonatales de NAS modifica la maduración del sistema nervioso a nivel estructural y funcional reflejándose a nivel conductual. Además, ponen de relieve la importancia de los niveles basales de NAS durante el neurodesarrollo, junto con su interacción con el sistema GABAérgico. El conjunto de datos muestra que las alteraciones en los niveles de NAS durante el periodo postnatal temprano podrían modificar la funcionalidad de algunos sistemas de neurotransmisores, en los que también se incluye el sistema serotoninérgico.

3. Diferencias individuales y vulnerabilidad al consumo de drogas

Uno de los rasgos de comportamiento antes descritos (exploración en situación de novedad) ha sido relacionado con un patrón de búsqueda de sensaciones/novedad, que al mismo tiempo se ha vinculado con la vulnerabilidad al uso y/o abuso de varias drogas (Belin y Deroche-Gamonet, 2012; Deroche-Gamonet y Piazza, 2014; Manzo et al., 2014). Estos rasgos fueron descritos entre los años 60 y 80, cuando surgieron varias teorías de tradición biologicista que recogieron los diversos fenotipos de personalidad y los clasificaron en diferentes dimensiones. La búsqueda de sensaciones fue definida como una tendencia a buscar experiencias emocionales intensas (Zuckerman, 1974) y la búsqueda de novedad como una predisposición hacia la exploración y la emoción en respuesta a la novedad (Cloninger et al., 1993). Estos autores sugirieron una posible relación de la búsqueda de sensaciones y novedad con la activación del sistema dopaminérgico, además de vincularlas con el consumo de drogas. Piazza (1989) fue uno de los primeros en considerar estas diferencias interindividuales y la forma en que los animales responden a las drogas, incorporando el concepto de la vulnerabilidad al consumo o abuso de sustancias en estudios preclínicos.

Se ha observado que la búsqueda de sensaciones es un constructo multifacético donde también se engloba la búsqueda de novedad (Arnett, 1994; Belin y Deroche-Gamonet, 2012; Belin et al., 2016), aunque se ha propuesto que estos dos rasgos son dissociables (Cain et al., 2005, Belin et al., 2011; Flagel et al., 2014). En ese sentido, Lee y sus colaboradores (2011) realizaron un estudio en el que no encontraron diferencias en la conducta de búsqueda de novedad

en ratas seleccionadas para la búsqueda de sensaciones cuando se les daba la opción de explorar un ambiente nuevo frente uno familiar. El rasgo de búsqueda de sensaciones se infiere a través de la reactividad motora de animales en un entorno nuevo (Dellu et al., 1996; Piazza et al., 1989). En cambio, la búsqueda de novedad es estudiada a través de la preferencia por entornos novedosos vs. familiares usando la prueba del condicionamiento de preferencia por un lugar (CPP; por *Conditioned Place Preference*) que consta de dos compartimentos que difieren en intensidad de luz, apertura, color y textura (Belin et al., 2016) o la preferencia por un objeto nuevo frente a uno familiar (NOP; por *Novel Object Preference*) (Ennaceur et al., 2010; Parkitna et al., 2013; Montagud-Romero et al., 2014; dela Peña et al., 2015). Se ha propuesto que estos dos rasgos difieren en su capacidad para predecir la vulnerabilidad al consumo o al abuso de drogas (Belin et al., 2008; Deroche-Gamonet y Piazza, 2010; Belin y Deroche-Gamonet, 2012; Belin et al., 2016). Si bien la búsqueda de sensaciones puede estar presente en individuos dependientes, se ha observado que éstos mantienen cierto control sobre su consumo a diferencia de aquellas personas que expresan conductas más impulsivas (Ersche et al., 2013; Belin et al., 2016). Así, este rasgo ha sido relacionada con la adquisición del consumo de sustancias (Piazza et al., 1989; Klebaur et al., 2001; Belin et al., 2008). Por otro lado, el rasgo de búsqueda de novedad ha sido vinculado tanto con el consumo (Belin et al., 2016), como con el abuso junto con la severidad de la conducta adictiva (Belin et al., 2011; Fligel et al., 2014; Foulds et al., 2017).

Se ha sugerido que el vínculo entre la búsqueda de sensaciones y el consumo de drogas es debido a una mayor liberación de dopamina en el núcleo accumbens. Hooks y sus colaboradores (1991) observaron que aquellas ratas

que expresaban más actividad locomotoriz en respuesta a la novedad (patrón conductual vinculado a la búsqueda de sensaciones) presentaban niveles basales de dopamina más altos, además de una liberación mesolímbica más elevada de este neurotransmisor inducida por la administración de cocaína. Han sido hallados resultados similares en ratas Roman (ratas criadas selectivamente que expresan altos (RHA; por *Roman High Avoidance*) vs. bajos (RLA; por *Roman Low Avoidance*) niveles de evitación en pruebas de aprendizaje como la evitación activa en dos sentidos). Tournier y colaboradores (2013) observaron que las ratas RHA expresaban altos niveles de locomoción en el OF y tenían niveles basales de dopamina más elevados, además de presentar mayores niveles de liberación de dopamina inducida por anfetamina en el estriado comparado con las RLA (Tournier et al., 2013). En estudios con ratas seleccionadas según su nivel de locomoción en respuesta a un ambiente nuevo (búsqueda de sensaciones), se observa que aquellos animales con altos niveles de locomoción (HRs; por *High-Responders*) presentan una actividad dopaminérgica más alta en neuronas del área tegmental ventral (ATV) comparado con las ratas que responden con niveles locomotrices menores (LRs; por *Low-Responders*) (Marinelli y White, 2000), así como una mayor liberación espontánea de dopamina en el núcleo accumbens (Flagel et al., 2010). Piazza y colaboradores (1991) también observaron niveles más altos de dopamina y uno de sus principales metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), en el núcleo accumbens y el estriado en las ratas HRs respecto las LRs. Los cambios en el nivel de estimulación del sistema dopaminérgico pueden modular tanto la afinidad como la densidad de los distintos subtipos de receptores dopaminérgicos, lo que resulta en una regulación al alza o a la baja de los

mismos (Creese et al., 1981). En ese sentido, se ha observado que las ratas HRs, las cuales presentan elevados niveles basales de dopamina, expresan niveles más bajos del receptor tipo 2 de la dopamina (D2), y del ARNm que lo codifica en el núcleo accumbens (Hooks et al., 1994; Kabbaj, 2004; Blanchard et al., 2009; Flagel et al., 2010; Tournier et al., 2013) y en el estriado ventral (Dalley et al., 2007). Además, al administrar un agonista dopaminérgico selectivo para D2, las ratas HRs necesitan una dosis más elevada para que se obtenga un efecto inhibitorio (Marinelli y White, 2000). En humanos, se ha comprobado que adictos a sustancias como el alcohol, presentan una deficiencia del receptor D2 comparado con personas no dependientes (Volkow et al., 1996). También se ha observado que aquellos sujetos con bajos niveles de receptores D2 describen como placentera la administración de un derivado amfetamínico, el hidrocloreto de metilfenidato, mientras que los individuos con altos niveles del receptor lo consideran desagradable (Volkow et al., 1999). Por otro lado, el receptor tipo 4 de la dopamina (D4) ha sido vinculado con la búsqueda de novedad. El receptor D4 se puede localizar en corteza frontal, en estriado, en hipotálamo y en el hipocampo (Aguirre-Samudio y Nicolini, 2005). Duluwa y colaboradores (1999) compararon ratones knock-out para el gen DRD4 que codifica este receptor (D4-KO) con ratones de tipo salvaje (*wild-type*). Comprobaron que los ratones D4-KO presentaban una menor preferencia por explorar un objeto nuevo frente uno familiar que los ratones *wild-type*. Otro estudio en que se administró un agonista del receptor D4 en ratones corroboró estos resultados, ya que la administración de un agonista del receptor D4 provocó un aumento de la exploración de un objeto nuevo, mientras que este tratamiento no provocó ningún efecto en la actividad motora en un ambiente nuevo (Powell et al., 2003).

En comparación con el sistema dopaminérgico, un menor número de estudios han abordado el papel de otros sistemas de neurotransmisores, como por ejemplo el sistema serotoninérgico, en el procesamiento de búsqueda de sensaciones o novedad. La serotonina modula la liberación de dopamina a través de una interacción compleja de señalización excitadora y/o inhibitoria mediada por los diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos (Alex y Pehek, 2007; Deehan et al., 2016). Ejerce su acción de forma excitatoria a través de los receptores 5-HT₃ (Campbell et al., 1996; Liu et al., 2006) y de los receptores de la serotonina de tipo 2A (5-HT_{2A}; Ding et al., 2009) en el ATV, y de tipo 1A (5-HT_{1A}) en la vía nigroestriada (Kelland et al., 1990), y de forma inhibitoria a través de los receptores serotoninérgicos tipo 2C (5-HT_{2C}; Di Matteo et al., 1999; Di Matteo et al., 2002) y 1B (5-HT_{1B}; Yan et al., 2004) en el ATV. Según Blanchard y colaboradores (2009), niveles bajos de serotonina podrían contribuir a la tendencia de búsqueda de sensaciones, ya que se asocia con una falta de control de los impulsos (Evdenden, 1999). En ese sentido, se ha observado que las ratas HRs tienen niveles basales más bajos de serotonina y de su principal metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), en la corteza prefrontal, núcleo accumbens y cuerpo estriado dorsal (Piazza et al., 1991). También se ha visto que sujetos que obtienen altas puntuaciones en un test de búsqueda de sensaciones presentan una hipoactivación serotoninérgica (Netter et al., 1996). Por otro lado, hay pocos estudios dedicados al sistema serotoninérgico y la búsqueda de novedad, los cuales se centran en la búsqueda de un genotipo que predisponga a la búsqueda de novedad (Rangel-Gomez y Meeter, 2016), y en los que se encuentran resultados contradictorios difíciles de reconciliar (Heitland et al., 2013; Fischer et al., 2015). Por otro lado, estudios con roedores han

demostrado que la alteración del sistema serotoninérgico promueve la autoadministración de drogas (Lyness et al., 1980; Leccese y Lyness, 1984; Loh y Roberts, 1990) incluyendo el EtOH (Deehan et al., 2016). Se ha observado en ratones que presentan una deficiencia congénita de serotonina exhiben un mayor consumo de EtOH y una menor sensibilidad a sus efectos sedantes (Sachs et al., 2014). También se ha comprobado que las ratas preferidoras de EtOH presentan niveles más bajos de serotonina en diferentes regiones cerebrales, entre ellas el cuerpo estriado, comparado con ratas no preferidoras de EtOH y de la cepa Wistar (Murphy et al., 1982), resultados que concuerdan con los obtenidos en pacientes alcohólicos, los cuales presentan niveles reducidos de serotonina y 5-HIAA comparado con sujetos control (Borg et al., 1985). Las evidencias existentes sugieren que la serotonina juega un papel importante en el uso de drogas, además de ejercer una posible influencia en el perfil conductual de búsqueda de sensaciones.

4. Las interacciones entre los NAS y el EtOH

El EtOH es una de las drogas más consumida. En 2015, las estimaciones globales sugerían que uno de cada cinco adultos había consumido esta droga de manera episódica e intensa en el último mes (World Health Organization, 2016). Europa es la zona con la prevalencia de consumo más alta. Concretamente, se ha registrado un mayor consumo de alcohol per cápita anual (alrededor de los 11.50 litros) y un mayor porcentaje de ingesta entre los consumidores (entre el 40-50%) comparado con el resto de los continentes (para una revisión ver Peacock et al., 2018).

Tanto el EtOH como los NAS 3α -reducidos comparten un perfil conductual similar, es decir, de tipo ansiolítico, sedativo y anticonvulsivo (Barbaccia, 2004). Debido a que estas sustancias actúan como moduladores alostéricos positivos del receptor GABAA (Grobin et al., 1998; Silvers et al., 2003), es esperable una interacción entre ellas. Hirani y colaboradores (2005) pusieron de manifiesto que el pretratamiento con el inhibidor de la 5α -reductasa, finasteride, atenúa la acción ansiolítica del EtOH, sugiriendo que los efectos ansiolíticos del EtOH podrían estar siendo, en parte, mediados por los niveles endógenos de NAS. Se ha observado que la alteración de los niveles fisiológicos de NAS puede alterar el consumo de EtOH, ya que la administración sistémica de allopregnanolona produce un aumento de la ingesta de EtOH en ratas no dependientes que previamente presentaban bajos niveles de consumo, mientras que disminuye la ingesta en ratas dependientes con altos niveles de consumo previos (Janak et al., 1998; Morrow et al., 2001). Esta disminución también ha sido documentada en ratas que presentaban altos niveles de consumo tras la administración intrahipocampal de allopregnanolona (Martín-García et al., 2007). Por otro lado, la administración de dosis bajas (3.2mg/kg i.p.; 50ng i.c.v.) de allopregnanolona aumenta la ingesta de EtOH en ratones, mientras que a altas dosis (17 y 24mg/kg i.p.; 400ng i.c.v.) la disminuye, tanto en un paradigma de acceso limitado a la droga en que la allopregnanolona es administrada sistémicamente (Ford et al., 2005), como en condiciones de condicionamiento operante en que la allopregnanolona es administrada a nivel central (Ford et al., 2007). Estos resultados sugieren que el efecto de la administración de allopregnanolona sobre el consumo es dosis-dependiente. Además, la alteración en la autoadministración de EtOH provocada por la manipulación de los niveles de

NAS difiere según el sexo del animal, ya que ha sido descrito que los ratones hembra son menos sensibles que los machos a los efectos de la manipulación de los niveles de allopregnanolona sobre la ingesta de EtOH (Ford et al., 2005; Ford et al., 2008 y Ford et al., 2015). Por otra parte, la administración intrahipocampal de allopregnanolona revierte las convulsiones audiógenas inducidas por la retirada de EtOH además de disminuir otros signos de abstinencia como la rigidez de la cola y el cuerpo (Martin-Garcia y Pallarés, 2005), mientras que el finasteride aumenta su severidad (Gililand-Kaufman et al., 2008).

El EtOH también puede alterar los niveles endógenos de NAS, ya que se ha observado que tanto la administración (i.p.) como la ingesta de EtOH producen un aumento de los niveles de allopregnanolona en la corteza y el hipocampo en animales adultos (Barbaccia et al., 1999; VanDoren et al., 2000; Morrow et al., 2001), así como en plasma de humanos adolescentes (Torres y Ortega, 2003b; Torres y Ortega, 2004). Además, se ha verificado que el desarrollo de tolerancia a los efectos del EtOH produce una reducción de la producción de allopregnanolona (Janis et al., 1998; Morrow et al., 2001).

A parte de su acción sobre el sistema GABAérgico, tanto el EtOH como los NAS pueden actuar a nivel serotoninérgico. Concretamente, el EtOH actúa como modulador alostérico positivo del receptor 5-HT₃ (Lovinger, 1999; Deehan et al., 2016) y la allopregnanolona a dosis altas puede actuar como modulador alostérico negativo de este receptor (Wetzel et al., 1998; Rupprecht, 2003; Giatti et al., 2018). El receptor 5-HT₃ parece estar relacionado con las propiedades reforzantes del EtOH a través de la modulación de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Minabe et al., 1991; Rasmussen et al., 1991; Campbell y

McBride, 1995; Campbell et al., 1996; Deehan et al., 2016). Se ha observado que la administración sistémica de antagonistas del receptor 5-HT₃ reduce de manera efectiva el consumo de EtOH en ratas que tienen libre acceso a la droga (Fadda et al., 1991; McKinzie et al., 1998; Heilig y Egli, 2006; Sari et al., 2011), aunque parece ser que su efectividad depende de múltiples factores, como la dosis, las condiciones de consumo de EtOH, la duración del tratamiento farmacológico o el sexo y la cepa de los animales (McKinzie et al., 1998; Knapp y Pohorecky, 1992; Pei et al., 1993, Moore et al., 2014). Por ejemplo, diversos antagonistas del receptor 5-HT₃, incluido el ondansetron, reducen el consumo de EtOH en ratas tanto si el tratamiento es agudo como crónico (Beardsley et al., 1994; Knapp y Pohorecky, 1992; Tomkins et al., 1995), pero parece ser que podrían ser más efectivos para reducir el consumo de EtOH en paradigmas de libre acceso a la droga, que en uno de acceso limitado o que en paradigmas de respuesta operante (McKinzie et al., 1998; Sari et al., 2011). Además, el antagonista del receptor 5-HT₃ ondansetron ha demostrado ser más eficaz para reducir el consumo de EtOH en individuos con alcoholismo de aparición temprana, que a menudo se asocia con el consumo excesivo de EtOH (Johnson et al., 2000). Aunque se ha comprobado que la eficacia de los antagonistas del receptor 5-HT₃ es distinta dependiendo de las condiciones de consumo después de la estabilización de la ingesta de etanol (McKinzie et al., 1998), no hay estudios centrados en sus posibles efectos en los períodos iniciales de ingesta de EtOH que pueden ser importantes para el desarrollo del abuso de drogas.

5. Papel de los NAS en la vulnerabilidad al consumo de EtOH

El cerebro en desarrollo presenta un repertorio de respuestas de neuroplasticidad que normalmente no se observa en edad adulta (Ismail et al., 2017). Varios mecanismos contribuyen en el equilibrio entre la plasticidad neuronal y la homeostasis en el sistema nervioso durante el desarrollo, lo que permite estabilidad y flexibilidad a nivel sináptico (Johnston, 2004). Eventos adversos o estados patológicos pueden alterar la homeostasis normal del desarrollo y inducir un efecto neuroplástico aberrante que contribuye a un fenotipo neurofisiológico y conductual anormal (Ismail et al., 2017). Como se ha ido describiendo en apartados anteriores, los NAS juegan un papel clave en el correcto desarrollo estructural y funcional del cerebro. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio ponen de manifiesto la importancia de los niveles de NAS durante el neurodesarrollo postnatal temprano, tanto en el comportamiento adolescente como en animal adulto, particularmente en respuesta a situaciones ambientales nuevas (ver apartado 1.2.).

En trabajos recientes observamos que la manipulación neonatal de NAS mediante la administración de finasteride aumentaba el consumo de una solución de EtOH (Llidó et al., 2016a; Llidó et al., 2016b). Estos animales presentaban niveles más bajos de dopamina y serotonina en el estriado ventral que el resto de los grupos (Llidó et al., 2016a), además de una disminución en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens después de la presentación de EtOH o de alimento (Llidó et al., 2016b). El presente trabajo pretende profundizar en los mecanismos por los cuales la alteración neonatal de los niveles de NAS provoca un aumento del consumo de EtOH. Los bajos niveles en la liberación de

dopamina observados en el núcleo accumbens de estos animales (Llidó et al., 2016b) sugieren una posible hipoactividad dopaminérgica que podría haber inducido una disminución en la sensibilidad al valor reforzante del EtOH provocando un aumento de su consumo (Blum et al., 1996; Blum et al., 2000). Blum propuso por primera vez que un déficit en la función dopaminérgica mesocorticolímbica podía conducir a la búsqueda de drogas, el consumo y la recaída (Febo et al., 2017). La alta o baja sensibilidad del sistema de la recompensa ante la presentación de una droga y su implicación en el uso o abuso de la misma ha sido un tema considerado por varios investigadores y ha generado cierta controversia (para una revisión ver Leyton y Vezina, 2014; Febo et al., 2017). Aunque se ha observado que la aparición de señales relacionadas con la droga puede provocar la liberación de dopamina fomentando la búsqueda de drogas (Berridge y Robinson, 2003; Salamone, 2007; Stewart, 2008) hay evidencias de que una disminución de la respuesta dopaminérgica frente a la droga puede ser un rasgo de vulnerabilidad preexistente (Casey et al., 2014). Asimismo, se ha observado que aquellos sujetos que presentan un trastorno severo de abuso de sustancias exhiben una baja respuesta dopaminérgica inducida por amfetamina (Volkow et al., 2012; Trifilieff y Martinez, 2014). Además, se ha comprobado que la administración del precursor de la dopamina, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), en animales que presentan una señal fásica de dopamina reducida en el cuerpo estriado ventromedial inducida por el alto consumo de cocaína, restablece la dopamina estriatal y reduce la ingesta escalada de cocaína (Willuhn et al., 2014). Este conjunto de datos iría en consonancia con la hipótesis hipodopaminérgica propuesta por Blum y colaboradores (1996; 2000). Por otra parte, la inhibición dopaminérgica parece

inducir una disminución en la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH (Brabant et al., 2014). Propuesto originalmente por Wise y Bozarth (1987), las sustancias adictivas con capacidad para producir estimulación psicomotora activan un mecanismo común, siendo uno de sus componentes las fibras dopaminérgicas que proyectan desde el mesencéfalo hasta regiones tanto corticales como límbicas (circuito neural del refuerzo y la búsqueda de la recompensa) (Phillips y Shen, 1996; Söderpalm y Ericson, 2013). Por lo tanto, la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH podría desempeñar un papel clave en los aspectos motivacionales para buscar la droga, influyendo en la vulnerabilidad al inicio y establecimiento del consumo.

Hasta ahora, en nuestro grupo nos hemos centrado en estudiar el papel de los NAS en el neurodesarrollo postnatal temprano, pero hay otras etapas como la adolescencia donde los NAS también ejercen un rol importante (ver apartado 2). La adolescencia es un período de adaptación necesario para la especialización de los sistemas cerebrales (Luna et al., 2015; Romeo, 2017), y parece ser crucial para el desarrollo del consumo de drogas y/o padecer una futura adicción (Laviola et al., 2003). En el presente trabajo se administró PROG durante la adolescencia con el fin de mimetizar el aumento de los niveles de allopregnanolona inducido por el estrés agudo (Moran y Smith, 1998; Pisu et al., 2016). Se ha comprobado que el estrés durante la adolescencia temprana, además del inicio precoz al consumo de drogas, puede aumentar la probabilidad de autoadministración y abuso de sustancias adictivas durante la adultez (Spear, 2015).

Existen diferentes factores de vulnerabilidad involucrados en el consumo de EtOH, como la sensibilidad a los efectos estimulantes de esta droga o el rasgo

conductual de búsqueda de novedad, los cuales juegan un papel importante en el valor reforzante del EtOH, mediado en parte por el receptor 5-HT₃. Ha sido documentado que los animales tratados neonatalmente con finasteride, los cuales consumen más EtOH, presentan niveles más bajos de serotonina en el estriado ventral comparado con el resto de los grupos (Llidó et al., 2016a). Se ha sugerido que las diferencias en la señalización serotoninérgica pueden estar participando en la vulnerabilidad al alcoholismo (Heilig et al., 2011; Yaakob et al., 2011; Barker et al., 2014). Además, aquellos animales que expresan un patrón de búsqueda de sensaciones también presentan niveles basales bajos de serotonina (Piazza et al., 1991; Netter et al., 1996; Blanchard et al., 2009). Como ya se ha dicho, el patrón de búsqueda de sensaciones juega un papel clave en la vulnerabilidad al consumo de sustancias (Belin y Deroche-Gamonet, 2012; Belin et al., 2016). Hasta ahora, los estudios preclínicos que relacionan los niveles de serotonina en ratas con los rasgos de búsqueda de sensaciones y novedad se han limitado a estudiar la reactividad locomotriz en espacios nuevos (método utilizado para estudiar la búsqueda de sensaciones). Sería necesario realizar pruebas de preferencia por la novedad como el CPP o NOP. Por otra parte, es sabido que la serotonina modula la liberación de dopamina en las vías dopaminérgicas a través de varios receptores (ver Alex y Pehek, 2007). De la amplia gama de subtipos de receptores serotoninérgicos que se conocen, el 5-HT₃ es el único receptor ionotrópico (Barnes y Sharp, 1999), sobre el cual actúan tanto el EtOH (Lovinger, 1999; Deehan et al., 2016) como los NAS (Wetzel et al., 1998; Rupprecht, 2003; Giatti et al., 2018). Teniendo en cuenta que este receptor puede estar modulando la motivación por la búsqueda de la recompensa inducida por el EtOH, la alteración del patrón de consumo de esta droga,

provocada por la manipulación neonatal de NAS, podría estar siendo mediada también, en parte, por el receptor 5-HT3.

Esta tesis pretende estudiar cómo los niveles de NAS neonatales y durante la adolescencia pueden ejercer un rol en el riesgo a consumir EtOH modulando algunos de los diferentes mecanismos de vulnerabilidad antes mencionados.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar los efectos de la manipulación de los niveles de NAS durante periodos críticos del neurodesarrollo, como la etapa neonatal y la adolescencia, en la vulnerabilidad al consumo de EtOH.

Experimento 1:

Objetivos:

- Estudiar el efecto de la manipulación de los niveles de NAS mediante la administración de allopregnanolona o finasteride durante el periodo neonatal y la administración de PROG durante la adolescencia temprana en una conducta emocional de tipo ansioso en el EPM en edad adolescente.
- Estudiar el efecto de la manipulación de los niveles de NAS durante la etapa postnatal y la adolescencia tempranas sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices de dosis bajas de EtOH en edad adulta.

Experimento 2a:

Objetivos:

- Estudiar el efecto de la administración neonatal de allopregnanolona o finasteride en la tendencia a la preferencia por la novedad, midiendo la NOP.

- Estudiar el efecto de la administración neonatal de allopregnanolona o finasteride sobre la sensibilidad a los efectos de un antagonista del receptor 5-HT3 en el consumo inicial de EtOH.

Experimento 2b:

Objetivos:

- Observar si la administración neonatal de allopregnanolona o finasteride afectará la expresión del receptor 5-HT3 en el mesencéfalo de crías de rata.
- Observar si la administración neonatal de allopregnanolona o finasteride afectará la expresión del receptor 5-HT3 en el estriado ventral de animales adultos, tras el consumo de EtOH y/o el tratamiento con ondansetron.

HIPÓTESIS GENERAL:

La vulnerabilidad al consumo de EtOH, en la que están implicadas la sensibilidad a los efectos estimulantes de esta droga, la preferencia por la novedad, y el consumo en estadios iniciales, y, por otro lado, la expresión del receptor 5-HT3 (receptor implicado en la liberación de dopamina mesolímbica), se verán afectadas por la manipulación de los niveles de NAS en el período neonatal y/o durante la adolescencia temprana en ratas Wistar macho.

EXPERIMENTO 1

MÉTODOS

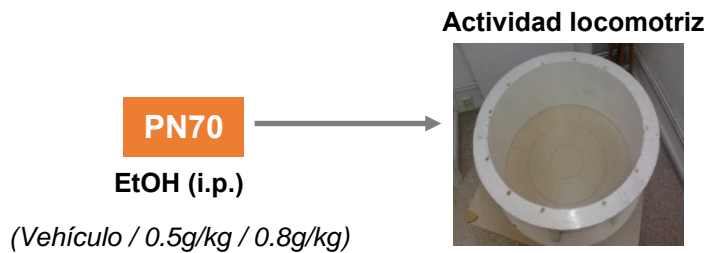
El objetivo del primer experimento es estudiar el efecto de la manipulación de los niveles de NAS neonatales y adolescentes sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH en edad adulta. La dosis estimulante de EtOH puede variar entre especies y cepas (Masur et al., 1986). Estudios previos pusieron de manifiesto que 0.5g/kg de EtOH producía un efecto estimulante ratas Long-Evans macho (Blakley y Pohorecky, 2006), pero no en ratas Sprague-Dawley macho (Chuck et al., 2006). Así que se realizó un estudio preliminar con la finalidad de determinar la dosis de EtOH necesaria para provocar efectos estimulantes en nuestros animales (ratas Wistar macho). Se evaluaron los efectos de la administración de 0.5g/kg y 0.8g/kg de EtOH en el OF durante 20 minutos. Se utilizaron animales que no habían sido manipulados (NH), excepto por las prácticas habituales derivadas de las condiciones de estabulación.

Para observar el efecto de la manipulación de los niveles de NAS neonatales y adolescentes sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH en edad adulta, se administró allopregnanolona (20mg/kg) o finasteride (50mg/kg) entre PN5-PN9. Como control se incluyeron un grupo administrado con vehículo y otro NH. Además, en la adolescencia temprana (PN30), la mitad de los sujetos fueron tratados con PROG (25mg/kg) durante tres días consecutivos con el fin de mimetizar el aumento de los niveles de allopregnanolona inducido por el estrés agudo (Purdy et al., 1991; Barbaccia et al., 1996; Barbaccia et al., 1997; Moran y Smith, 1998; Cozzoli et al., 2014; Pisu et al., 2016). Siguiendo con los objetivos marcados, 30 minutos después de la última inyección de PROG se realizó la prueba de EPM para medir la conducta

emocional de los animales. En edad adulta (PN70), se administró la dosis de 0.5g/kg de EtOH que había demostrado ser efectiva para provocar un efecto estimulante en el estudio preliminar. Diez minutos después de la administración, se midió el nivel de locomoción de los animales en un aparato OF durante 20 minutos.

EXPERIMENTO 1. *Effects of neonatal and adolescent neuroactive steroid manipulation on locomotor activity induced by ethanol in male Wistar rats*

A. *Búsqueda de una dosis estimulante de EtOH*



B. *Efectos de la manipulación de los niveles de NAS neonatales y adolescents en la actividad locomotriz inducida por el alcohol*

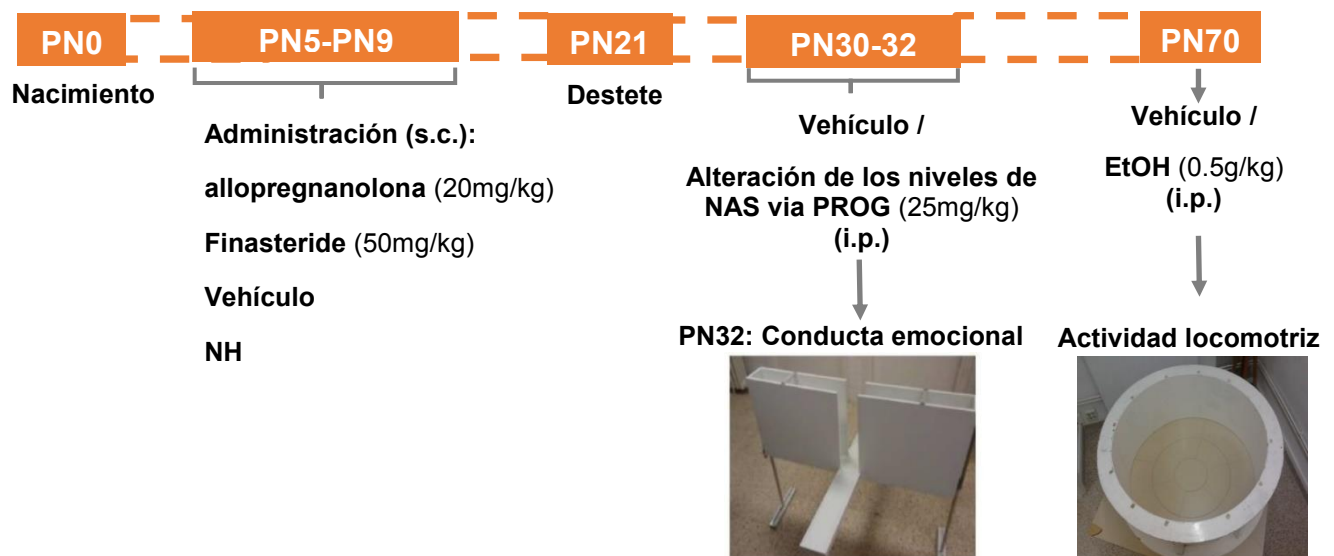


Figura 4. Diseño experimental del experimento 1

RESULTADOS

Publicado en forma final editado por: *Behav Brain Res.* 2017 Jul 14;330:68-74. doi: 10.1016/j.bbr.2017.05.009

Effects of neonatal and adolescent neuroactive steroid manipulation on locomotor activity induced by ethanol in male Wistar rats

Bartolomé I., Llidó A., Darbra S., Pallarès M.

Abstract

Neonatal neuroactive steroids levels are crucial for brain development. Alterations of neonatal neuroactive steroids levels induce anxiolytic-like effects and improve exploration in novel environments in adulthood. These behavioural traits, i.e. sensation/novelty seeking, anxiety or impulsivity, are associated with vulnerability to drug use and abuse. Adolescence is also recognized as a particularly critical developmental phase to contribute to vulnerable phenotype. However, the influence of neuroactive steroids during development in the vulnerability to drug addiction has been poorly studied. The aim of the present experiment is to study the effect of early neonatal and adolescent manipulations of neuroactive steroids on the sensitivity to the stimulant effects of ethanol in adult male rats. Therefore, allopregnanolone or finasteride, an allopregnanolone synthesis inhibitor, were injected from postnatal day 5 to 9. In early adolescence, half of the subjects were injected with progesterone, the main allopregnanolone precursor, and the elevated plus-maze anxiety test was performed. Results indicated that early adolescent progesterone induced anxiolytic-like effects (increase in the percentage of entries and time in open arms). Neonatal finasteride administration decreased locomotor activity induced by ethanol in adolescent vehicle subjects. Interestingly, differences induced by neonatal treatments were not present in the animals that received progesterone in the early adolescence. In conclusion, neuroactive steroid manipulations in crucial stages of development could be playing an important role in behavioural effects of alcohol such as the sensitivity to locomotor stimulation.

Keywords: Allopregnanolone, Behaviour, Elevated plus-maze, Development, Neuroactive steroids

1. Introduction

In the central nervous system neuroactive steroids (NS) can rapidly alter the excitability of neurons by binding to membrane-bound receptors such as those for inhibitory or excitatory neurotransmitters [1]. Allopregnanolone (AlloP) is the natural progesterone (PROG) metabolite that acts as positive allosteric modulator of the GABAA receptors raising the frequency and duration

of chloride channel opening [2,3]. Increasing evidence indicates that the neonatal levels of AlloP are crucial for brain development. We have recently reported that changes in AlloP biosynthesis in the early neonatal period (from 5 to 9 postnatal days: PN5-PN9) affect GABAA receptor subunit expression in the hippocampus, which is accompanied by an altered behavioural response to PROG administration, even in adulthood [4]. Moreover, several studies have documented that the alteration of physiological levels of NS during early development, including AlloP, causes changes in behaviour which remain into adolescence and/or adulthood. For instance, it has been observed that the neonatal administration of AlloP increased locomotor activity in a novel environment [5], increased activity induced by amphetamine administration [6], reduced the anxiolytic-like effects of the benzodiazepine lorazepam [5], and decreased anxiety in the elevated plus-maze (EPM) test [7]. Importantly, these behavioural traits, i.e. sensation/novelty seeking, anxiety or impulsivity, are associated with vulnerability to use and abuse of several drugs including alcohol [8,9,10]. Accordingly, animal models data could be suggesting that neonatal NS levels could participate in individual vulnerability to drug use or abuse. In this line, recent results from our laboratory have shown that neonatal NS manipulation by means of finasteride administration (a 5 α -reductase inhibitor [11], enzyme that participates in the synthesis of AlloP and other NS including dihydrotestosterone), increases alcohol consumption in adult rats in the first [12] or the second week of consumption [13], depending on the intake procedure. Furthermore, neonatal AlloP increased alcohol consumption in comparison with vehicle controls in the thirteenth and fourteenth days of consumption [13].

On the other hand, both ethanol (EtOH) and AlloP act on the GABAA receptors. In fact, EtOH effects on behaviour are remarkably similar to the effects of GABAA positive modulators such as AlloP, which shares the anxiolytic, anticonvulsant and sedative profile [14,15,16] with EtOH [17,18]. Regarding EtOH consumption, it has been observed that the administration of AlloP increases alcohol intake in nondependent rats with low consumption levels [19], although this effect seems to depend on the previous history of ethanol consumption. For instance, AlloP administration decreases EtOH consumption in dependent rats with high levels of consumption [20]. In fact, previous experiments have shown that manipulation of NS levels alters ethanol self-administration differentially depending on the sex of mice [21,22]. Reciprocally, EtOH also affects the levels of NS, as indicated by the fact that its administration or consumption produces an increase of AlloP levels in the cortex and hippocampus [20,23,24,25] as well as the development of tolerance to the effects of EtOH implies a reduction of increased AlloP production [20,26]. Moreover, it has been observed that intrahippocampal AlloP administration eliminates signs of EtOH withdrawal, such as seizures and body rigidity [27,28], and the intracerebral administration of finasteride increases the severity of these signs [29]. Therefore, alterations in brain NS levels can be an important factor modulating EtOH action on GABAA receptors, and may be contributing to the addictive properties of this drug. Although post-mortem AlloP levels in brain structures such as ventral tegmental area are increased in alcohol use disorder patients [30] and EtOH seems to differentially affect AlloP levels in several brain regions [31], the contribution of NS in critical periods of development to individual vulnerability to drug abuse has been poorly studied.

In order to study the effect of neonatal NS on the sensitivity to the stimulant effects of EtOH in adulthood, AlloP or finasteride were neonatally administered (PN5-PN9) to rat pups. Since it has been described that adolescence is also crucial for the development of drug use and future addiction [32] and is an adaptative period necessary for the specialization of brain systems [33], in early adolescence (30 days old) [34] the animals also received the main precursor of AlloP (PROG). It has been pointed out that exposures to drugs or stress, which include the early adolescent period, seem to be more likely to impact later on self-administration and social/affective behaviours; whereas exposures in late adolescence may be more likely to influence cognitive tasks whose neural substrates are still undergoing maturation at that time [35]. On the other hand, the physiological anxiolytic profile of PROG seems to be mediated by its reduced metabolite AlloP [36,37]. Thus, to mimic stress-induced increase in AlloP brain levels [38,39], anxiety-like behaviour was evaluated by means of an EPM after PROG administration in early adolescence. Finally, the locomotor response to the stimulating effects of EtOH was evaluated in adulthood. If neonatal NS manipulation by means of finasteride administration alters the adult pattern of alcohol consumption [12,13], it is coherent to hypothesize that several effects of alcohol (such as the sensitivity to motor stimulant effects) would be altered. Because stimulant dose of alcohol may vary across species and strains [40], we conducted a preliminary dose-response experiment in order to determine the stimulant dose in male Wistar rats. Taking into account all this data, our hypothesis is that the manipulation of NS in neonatal period and/or in early adolescence will alter the behavioural profile of low doses of alcohol (locomotor stimulating effects).

2. Materials and methods

2.1. EXPERIMENT 1: EtOH effects on locomotor activity

2.1.1. Animals

Thirty male Wistar rats were bred in the Laboratory of Psychobiology (Autonomous University of Barcelona), and housed in a temperature-controlled animal room (22-24°C) on 12h light/dark cycle (lights on at 8:00H) on a food and water *ad libitum* schedule. After weaning (postnatal day (PN) 21)) males were separated into groups of siblings with a maximum of four and a minimum of two animals per cage (46.5 x 21.5 x 19.5 cm). All animals were obtained, housed, and sacrificed in accordance with the protocol approved by the Committee of the Autonomous University of Barcelona for Care and Use of Experimental Animals and the Department of Environment from Generalitat de Catalunya. This protocol follows the guidelines approved by the European Council Directive (2010/63/EU).

2.1.2. Locomotor response to EtOH doses

In adulthood (PN70), animals were randomly divided into three groups (n=10 per group), two of these groups were administered (i.p.) with two EtOH doses (0.5g/kg or 0.8g/kg) dissolved in 0.9% NaCl (10% v/v) and another group administered with vehicle (0.9% NaCl, control group).

We have chosen these doses as one of them (0.5g/kg) has shown stimulant effects on locomotor behavior in the open field test in Long-Evans rats [41]. Locomotor activity was measured 10 minutes after EtOH or vehicle administration in an open field apparatus, which consisted of a circular arena (81.5 cm diameter) a wall 31.5 cm high. The duration of the test was 20 minutes. The open field was located in a separate room lit illuminated by a dim light (average 36 lx). Each subject was individually placed in the centre of the apparatus at the beginning of the test. After each trial, the apparatus was cleaned with an aqueous solution containing EtOH (20% v/v) to prevent olfactory cues. Locomotor response was evaluated by means of an activity monitoring system (SMART, Letica, Barcelona, Spain). This system is based on automated image analysis in real time, recorded by a video camera that is suspended from the ceiling over the apparatus. The total distance travelled was recorded as locomotor activity. Time-distance course was analysed by means of four slots of five minutes.

2.2. EXPERIMENT 2: Sensitivity to motor stimulant effects of EtOH

2.2.1. Animals

Male Wistar rats were housed with the same conditions as in Experiment 1. The day of birth (postnatal day 0) was strictly controlled and the litters were reduced to 10 pups. In order to avoid any effect of cohorts, each litter of the same parents was assigned to different neonatal treatments (see below). Females were sacrificed after weaning. No visible animal health alterations were detected during development as a consequence of the neonatal treatments. Differences in body weights were neither observed during development, nor when behaviour was evaluated (PN32, and PN70). The number of subjects of each experimental group is detailed in figures.

2.2.2. Neonatal Treatment

Pups were injected (s.c.) with AlloP (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, 20 mg/kg), finasteride (N-tert-Butyl-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-ene-17 β -carboxamide, 50 mg/kg) or VEH, once a day from the fifth to the ninth day after birth (PN5-PN9). Another control group was no-handled (NH) in the neonatal period, except for the weekly change and cleaning of home cages. AlloP and finasteride were dissolved in distilled water and 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. VEH injections consisted in 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin dissolved in distilled water. The doses were chosen based on previous experiments which show that they were effective in changing behaviour in adulthood [42]. For injections, each litter was removed from both parents and returned to their home cage in less than 12 minutes. The chemicals were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany).

2.2.3. Adolescent Treatment

In early adolescence (30 days old), animals were randomly distributed into two groups. One was injected (i.p.) with the AlloP precursor PROG (25mg/kg of progesterone-water soluble containing 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany))

and the control group was injected (i.p.) with VEH (distilled water + 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin). The administrations were carried out for three consecutive days, so animals received 3 injections in 48 hours. Similar steroid administration paradigms have been shown to alter the levels of circulating steroids in a physiological range [38,43]. Moreover, this range of doses elicited anxiolytic-like effects in male rats to a comparable degree observed previously in female rats [44].

2.2.4. Anxiety-like Behaviour

In early adolescence (PN32), anxiety-like behaviour was evaluated in the EPM 20 minutes after the last PROG injection. The EPM consisted of two open arms and two enclosed arms (10cm x 50cm) perpendicular to each other forming a cross elevated 50cm from the ground. The walls of the enclosed arms were 40cm high. The arms were connected by a square in the centre of the apparatus of 10cmx10cm. The animal was placed in the centre faced to an open arm and behaviour was recorded for 5 minutes. The maze was located in a room lit by a dim light (average 36lx) and cleaned each time with an aqueous solution containing ethanol (20% v/v) to minimize olfactory signals between trials. Every time the animal introduced all four limbs on the arm of the maze was counted as an entry. The variables recorded were the number of entries into the open and enclosed arms, total number of entries, and the time spent on the open and enclosed arms, discounting the time spent in the centre of the apparatus. The percentage of time spent in open arms and the percentage of entries into the open arms were used as measures of anxiety. Total entries (open + enclosed arms) were used as a locomotor activity index.

2.2.5. Sensitivity to motor stimulant effects of EtOH

In adult age (PN70), animals were randomly assigned to two groups: control or alcohol (0.5 g/kg i.p.) injections (see Experiment 1 for dissolution preparation). The locomotor response to the stimulant effects of EtOH was evaluated as described in Experiment 1.

2.3. Statistical Analysis

STATISTICA software (StatSoft, Tulsa, USA) for data analysis was used. In experiment 1, locomotor activity in the open field test was analysed by means of a mixed ANOVA with ETOH as between-groups factor (three levels: control, alcohol 0.5g/kg or alcohol 0.8g/kg) and TIME as intra-subjects factor (four levels: 0-5, 5-10, 10-15 and 15-20 minutes slots). In experiment 2, two-way ANOVAs were used in order to analyze the EPM variables, with NEO (neonatal treatment, 4 levels: VEH, AlloP, FIN, NH) and PROGESTERONE (adolescent treatment, 2 levels: VEH, PROG) factors. Locomotor activity in the open field test was analysed by means of a mixed four-way ANOVA with three between-groups factors: NEO, PROGESTERONE, and adult EtOH administration (ETOH, two levels: control or alcohol), and TIME as intra-subjects factor. Subsequent ANOVA partitions and post-hoc Duncan tests were performed when needed. Data

are shown as mean \pm SEM. Partial eta squared (η^2) has been included in order to provide effect size estimations.

3. Results

3.1. Experiment 1

ANOVA showed a significant effect of ETOH [$F(2,27)=44.36$; $p<0.001$, $\eta^2=0.98$] and TIME [$F(3,81)=20.19$; $p<0.001$, $\eta^2=0.95$] along with an interaction effect ETOH x TIME [$F(6,81)=5.00$; $p<0.001$, $\eta^2=0.83$] factors in the distance travelled. Subsequent post-hoc Duncan tests indicated that animals injected with 0.5g/kg of EtOH increased the distance travelled in comparison with control and 0.8g/kg groups in all the four slots analysed ($p<0.001$ for each of the 12 comparisons). Moreover, control and alcohol 0.8g/kg groups decreased activity from first to second time slot ($p<0.001$ for the two comparisons) and maintained low levels from second to fourth time intervals. Instead, alcohol 0.5g/kg group maintained high locomotion levels from first to third time interval, and showed a slight decrease in the last time interval in comparison with the first ($p<0.05$) (see Fig. 1 for details). Because 0.5g/kg of EtOH produced an increase in locomotor activity, we choose this dose for Experiment 2.

3.2. Experiment 2

3.2.1. Anxiety-like behaviour

The ANOVA of the anxiety-like behaviour in the EPM showed a significant effect of PROGESTERONE factor in the percentage of time spent in the open arms [$F(1,170)=8.15$; $p<0.01$, $\eta^2=0.89$], indicating that the animals injected with PROG in adolescence spent more time in the open arms than controls (see Fig. 2A). There were no significant effects of NEO [$F(3,170)=0.24$; N.S.] or NEO x PROGESTERONE interaction [$F(3,170)=0.20$; N.S.].

Regarding the percentage of entries into the open arms, the analysis of variance indicated a significant effect of PROGESTERONE factor [$F(1,170)=3.98$; $p<0.05$, $\eta^2=0.80$], making a greater number of entries the animals that were injected with PROG in adolescence compared to VEH (see Fig. 2B). Additionally, there were no significant effects of NEO [$F(3,170)=0.61$; N.S.] or NEO x PROGESTERONE interaction [$F(3,170)=0.79$; N.S.].

Moreover, no statistically significant differences were observed in total arm entries (see Fig. 2C) or in enclosed arm entries or time in central area (data not shown). Consequently, results indicate an anxiolytic-like profile in the EPM in the animals that were administered with PROG in adolescence, and no significant effects of neonatal treatment or the interaction between neonatal treatment and adolescent administration.

3.2.2. Sensitivity to motor stimulant effects of EtOH

The mixed four-way ANOVA showed a significant third order interaction between NEO x PROGESTERONE x ETOH x TIME [$F(9,486)=1.89$; $p=0.05$, $\eta^2=0.65$]. In accordance with our

hypothesis (see Introduction), we performed the subsequent partition analyses by PROGESTERONE factor.

In VEH adolescent animals, ANOVA showed a significant second order interaction NEO x ETOH x TIME [F(9,240)=2.3; $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.68$], indicating that ETOH effects in the locomotor activity (in 5 min-slots) was different depending on the neonatal treatment (NEO). The subsequent analysis split up by ETOH factor showed a significant NEO [F(3,41)=5.13; $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.84$] and TIME [F(3,123)=66.64; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.99$] effect in control group. Post-hoc Duncan tests indicated that NH group had a lower locomotor activity than the rest of the groups (NH < VEH ($p < 0.001$), AlloP ($p < 0.01$) and finasteride ($p = 0.01$)) (see Fig. 3A). This result indicates a possible injection effect, as there were no differences between the groups that received neonatal injections (VEH, AlloP and finasteride). Furthermore, as expected, distance travelled decreased over time in all NEO groups. In regards of those animals injected with stimulant dose of alcohol in adult age, ANOVA showed a significant effect of NEO factor [F(3,39)=2.97; $p < 0.05$, $\eta^2 = 0.75$], and TIME [F(3,117)=14.02; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.93$], along with a NEO x TIME interaction effect [F(9,117)=1.86; $p = 0.06$, $\eta^2 = 0.65$] that just failed to reach statistical significance. Subsequent analysis indicated that animals receiving neonatal finasteride showed lower sensitivity to locomotor stimulating effects of low doses of EtOH, as finasteride animals injected with 0.5 g/kg of EtOH showed low locomotion scores than the rest of the groups. Fig. 3C shows detailed group comparisons.

In animals that received PROG in adolescence, ANOVA showed significant effects of NEO [F(3,82)=4.88; $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.83$], ETOH [F(1,82)=65.55; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.99$], TIME [F(3,246)=78.93; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.99$], and NEO x ETOH [F(3,82)=9.8; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.91$] factors. Thus, the following analysis was split up by ETOH factor. When animals received VEH prior to locomotor activity, a significant NEO [F(3,37)=4.54; $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.82$] and TIME [F(3,111)=77.76; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.99$] effects were observed. As expected, TIME effect indicated that locomotor activity decreased in all groups. Analyzing NEO treatment effect, post-hoc Duncan tests indicated that neonatal VEH animals showed higher locomotor activity than NH animals ($p < 0.01$), AlloP and finasteride groups ($p = 0.01$) (see Fig. 3B). As in VEH adolescent animals, this result seems to indicate a manipulation effect, but in this case (animals injected with PROG in adolescence) locomotor activity of AlloP and finasteride groups decreased to the level of NH animals. In the same way, regarding to the locomotor response to EtOH, the analysis showed differences between NEO groups [F(3,45)=9.77; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.91$] and TIME evolution [F(3,135)=28.68; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.97$]. TIME effect also indicated that locomotor activity decreased in all groups. Regarding NEO effect, subsequent pot-hoc Duncan tests showed a higher locomotion in NH animals than neonatal VEH, AlloP and finasteride groups ($p < 0.001$ for all three comparisons; see Fig. 3D). Therefore, the locomotor activity increase induced by 0.5g/kg EtOH was higher in NH than VEH, AlloP or finasteride groups in those animals that were administrated with PROG in early adolescence. This result indicates that the differences in locomotor activity after EtOH injection between finasteride and the rest of the neonatal groups reported in adolescent subjects injected with VEH (Fig. 3C) were not maintained in the animals that were injected with PROG (Fig. 3D).

4. Discussion

The main data of the present experiments indicates neonatal finasteride administration decreased locomotor activity induced by a low EtOH dose which has stimulating motor effects in control animals (see Fig. 3C). This data suggests that neonatal NS manipulations can alter the behavioural response to a stimulant low dose of EtOH. Our data showing that a 0.5g/kg of EtOH dose produced a robust stimulant effect on locomotor behaviour in the open field test in male Wistar rats is consistent with recent data [45] and corroborates previous data reported in Long-Evans rats [41].

On the other hand, early adolescent PROG administration increased both the percentage of entries and time spent in the open arms without altering locomotor activity and independently of the neonatal treatment (see Fig. 2). Accordingly, early adolescent PROG administration induced an anxiolytic-like profile in the EPM. In adaptative responses to stress and anxiety, the physiological anxiolytic profile of PROG seems to be mediated by its reduced metabolite AlloP involving the regulation of the activity of GABAA receptors [36,37]. In fact, PROG has been qualified as a precursor of stress hormone in both sexes [37], and NS regulation of the GABAA receptors which is a relevant mechanism underlying anxiety disorders seems to be a non sex-specific phenomenon [46]. Thus, although AlloP levels were not directly measured in adolescent PROG-treated rats and PROG dose was quite elevated (25mg/kg, once a day for 3 days) it is likely that the anxiolytic-like effect of early adolescent PROG administration observed in our experiment could be related to its conversion into AlloP. In this way, it has been recently reported that subchronic PROG administration (5mg/kg, once a day for 5 days) increases both cortical and plasmatic AlloP levels in male rats [39]. However, other pharmacological effects of these high doses, besides increasing AlloP levels, cannot be discarded. In this regard, the anxiolytic-like effect observed in PROG-treated animals was predictable, but the lack of modulation of the behavioural response to PROG administration by neonatal NS manipulation was not expected. Previous data obtained in our laboratory showed that neonatal NS manipulation altered the response to novelty and exploration in adolescence and adulthood [5,47] as well as anxiety-like behaviour in adulthood [7]. Methodological aspects such as differences in doses, duration of treatment or developmental stages at behavioural evaluation could be relevant in explaining these discrepancies.

It is important to remark that the difference in the locomotor response to a stimulant dose of EtOH when comparing finasteride to AlloP or VEH groups was not observed in animals treated with PROG in early adolescence. That is, locomotor activity after the stimulant EtOH dose injection was significantly higher in NH animals than in the rest of the groups in PROG administered animals (see Fig. 3D), suggesting that some of the changes caused by neonatal alterations or manipulations of NS can be modulated by changes in early adolescent stage. In fact, adolescence is recognized as a particularly critical developmental phase which contributes to vulnerable phenotype, as well as a period when stress can influence the eventual development of certain psychiatric disorders [48]. In this way, PROG secretion by the adrenal glands is a

response to reduce stress is much stronger in pre-puberal male rats when compared to adults, and puberty is characterized by marked changes in adrenocortical responsiveness to stress [49,50,37].

A limitation of the present investigation arises in the lack of NS brain levels at the time the rats were tested. However, we have reported in previous experiments that neonatal finasteride administration (from PN5 to PN9) increased both the hippocampal levels of AlloP in PN9 [51] and the hippocampal GABAA $\alpha 4$ and δ -subunits expression in PN10 [4]. Moreover, this $\alpha 4$ and δ -subunits over expression induced by neonatal finasteride has been also detected in the adult hippocampus [4]. As a decreased expression of GABAA δ subunit has been linked to a decrease in alcohol consumption [52,53,54,55], consequently the increased δ expression induced by neonatal finasteride could be related to the increase in alcohol consumption previously reported [12]. Moreover, $\alpha 4\delta$ subunits are present in GABAergic terminals on the ventral tegmental area participating in the regulation of the excitability of dopaminergic neurons that project to the nucleus accumbens [56]. Thus, taken together our results suggest that possible changes in GABAA receptors related to neonatal finasteride administration and adolescent PROG administration could be also partially responsible for the effects on alcohol-induced locomotion. In fact, EtOH and AlloP bind with high affinity to GABAA receptors containing $\alpha 4$ and δ subunits [57,58,59], although AlloP through transmembrane sites [60], and EtOH-induced locomotor activity sensitization has been related to alterations in GABAA receptors [61,62]. In this way, GABAA receptors containing $\alpha 4$ and δ subunits are present in GABAergic terminals on the ventral tegmental area participating in the regulation of the excitability of dopaminergic neurons that project to the nucleus accumbens [56]. Interestingly, we have recently reported that neonatally finasteride-treated rats showed a decreased dopamine release in the nucleus accumbens in response to EtOH solution presentation [13], paired with a decreased ventrostriatal dopamine and 5-HT levels [12] after EtOH self-administration in a home-cage drinking procedure for two weeks. As a consequence, alterations in the expression of GABAA receptors containing $\alpha 4$ and δ subunits could also be related to the altered dopaminergic activity observed in finasteride-treated animals. However, new experiments are needed to verify this assertion.

On the other hand, neonatal AlloP had no effects on sensitivity to locomotor effects of EtOH at low doses. However, this lack of effect could be related to the dose used. Although the same AlloP dosages have shown no effects in adult GABAA receptors containing $\alpha 4\delta$ subunits [4], the voluntary alcohol intake recorded in the days 13th and 14th of consumption was higher than in neonatal vehicle injected animals when half of the AlloP dose (10mg/kg) was injected [12]. Thus, the use of lower doses is needed in order to discard any effect of neonatal AlloP in adult sensitivity to locomotor effects of EtOH.

Finally, NH group injected with VEH in adolescence presented lower locomotor activity than the rest of neonatal groups, including the neonatal control VEH (see Fig. 3A). This result indicates a possible effect of the neonatal manipulation due to injections. This manipulation effect was also observed in those animals treated with PROG in early adolescence. In PROG administered animals, the locomotor activity of AlloP and finasteride groups was statistically the

same than NH group, but different from neonatal VEH (see Fig. 3B). In this way, it has been reported that early-life environmental events can induce changes in adult behaviour and in neuroendocrine systems [63,64]. These results are in accordance with previous experiments carried out in our laboratory, showing a decrease in head dips exploration and an increase in anxiety-like behaviour in EPM in those animals that were neonatally administered with VEH compared to NH group, effect that was neutralized by the neonatal administration of AlloP [65].

4.1. Conclusions

Our data showed that 0.5g/kg of EtOH dose produced a robust stimulant effect on locomotor activity in the open field test in male Wistar rats. Furthermore, early adolescent administration of the main AlloP precursor, i.e. PROG at high dose, induced anxiolytic-like profile in the EPM. The main finding of the present experiment revealed that neonatal administration of finasteride reduced sensitivity to locomotor stimulating effects of low doses of EtOH in adulthood, and this difference between groups was not observed in adolescent PROG treated rats. Moreover, neonatal AlloP administration, at the dose used, did not affect sensitivity to locomotor effects of EtOH. In summary, this data shows that neonatal NS alterations affect the sensitivity to locomotor stimulant effects of a low EtOH dose and this effect can be modified by the administration of PROG in early adolescence, suggesting a contribution of neonatal and adolescent NS on the effects of low alcohol doses.

5. Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PSI2012-36646). Thanks to Paul Allen for providing language help.

6. References

- [1] Paul SM, Purdy RH (1992) Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6(6): 2311-22.
- [2] Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science.* 232: 1004–1007.
- [3] Gunn BG, Cunningham L, Mitchell SG, Swinny JD, Lambert JJ, Belelli D (2015) GABAA receptor-acting neurosteroids: a role in the development and regulation of the stress response. *Front. Neuroendocrinol.* 36: 28-48.
- [4] Modol L, Casas C, Navarro X, Llidó A, Vallée M, Pallarès M, Darbra S (2014) Neonatal finasteride administration alters hippocampal $\alpha 4$ and δ GABAAR subunits expression and behavioural responses to progesterone in adult rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17(2): 259-273.
- [5] Darbra S, Pallarès M (2009) Neonatal allopregnanolone increases novelty-directed locomotion and disrupts behavioural responses to GABA(A) receptor modulators in adulthood. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(6): 617-25.

- [6] Gizerian SS, Moy SS, Lieberman JA, Grobin AC (2006) Neonatal neurosteroid administration results in development-specific alterations in prepulse inhibition and locomotor activity: neurosteroids alter prepulse inhibition and locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 86: 334-342.
- [7] Darbra S, Pallarès M (2012) Effects of early postnatal allopregnanolone administration on elevated plus maze anxiety scores in adult male Wistar rats. *Neuropsychobiology* 65(1): 20-27.
- [8] Dalley JW, Fryer TD, Brichard L, Robinson ES, Theobald DE, Lääne K, Peña Y, Murphy ER, Shah Y, Probst K, Abakumova I, Aigbirhio FI, Richards HK, Hong Y, Baron JC, Everitt BJ, Robbins TW (2007) Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science*. 315(5816): 1267-1270.
- [9] Deroche-Gamonet V, Piazza PV (2014) Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control. *Neuropharmacology*. 76: 437-44.
- [10] Manzo L, Gómez MJ, Callejas-Aguilera JE, Donaire R, Sabariego M, Fernández-Teruel A, Cañete A, Blázquez G, Papini MR, Torres C (2014) Relationship between ethanol preference and sensation/novelty seeking. *Physiol. Behav.* 133: 53-60.
- [11] Mukai Y, Higashin T, Nagura Y, Shimada K (2008) Studies on neurosteroids XXV. Influence of a 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism. *Biol. Pharm. Bull.* 31(9): 1646-1650.
- [12] Llidó A, Bartolomé I, Darbra S, Pallarès M (2016) Effects of neonatal allopregnanolone manipulations and early maternal separation on adult alcohol intake and monoamine levels in ventral striatum of male rats. *Horm. Behav.* 82: 11-20.
- [13] Llidó A, Bartolomé I, Darbra S, Pallarès M (2016) Neonatal finasteride administration decreases dopamine release in nucleus accumbens after alcohol and food presentation in adult male rats. *Behav. Brain Res.* 309: 44-50.
- [14] Smith SS (2002) Withdrawal properties of a neuroactive steroid: implication for GABAA receptor gene regulation in the brain and anxiety behaviour. *Steroids*. 67: 519-528.
- [15] Belelli D, Bolger MB, Gee KW (1989) Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one. *Eur J Pharmacol.* 166: 325-329.
- [16] Frye CA (1995) The neuroactive steroid 3 α ,5 α -THP has anti-seizure and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy. *Brain Res.* 696: 113-120.
- [17] Barbaccia ML (2004) Neurosteroidogenesis: relevance to neurosteroid actions in brain and modulation by psychotropic drugs. *Crit. Rev. Neurobiol.* 16(1-2): 67-74.
- [18] Martín-García E, Darbra S, Pallarès M (2007) Implicación de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica. *Rev. Neurol.* 44(11): 661-676.
- [19] Janak PH, Redfern JE, Samson HH (1998) The effects of ethanol are altered by the endogenous neurosteroid, allopregnanolone. *Alcohol Clin Exp Res.* 22(5): 1106-12.
- [20] Morrow AL, VanDoren MJ, Penland SN, Matthews DB (2001) The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37: 98-109.
- [21] Ford MM, Beckley EH, Nickel JD, Eddy S, Finn DA (2008) Ethanol intake patterns in female mice: influence of allopregnanolone and the inhibition of its synthesis. *Drug Alcohol Depend.* 97(1-2): 73-85.

- [22] Ford MM, Nickel JD, Kaufman MN, Finn DA (2015) Null mutation of 5 α -reductase type I gene alters ethanol consumption patterns in a sex-dependent manner. *Behav. Genet.* 45(3): 341-353.
- [23] Barbaccia ML, Affricano D, Trabucchi M, Purdy RH, Colombo G, Agabio R, Gessa GL (1999) Ethanol markedly increases 'GABAergic' neurosteroids in alcohol-preferring rat. *Eur. J. Pharmacol.* 384(2-3): R1-2.
- [24] Torres JM, Ortega E (2004) Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 172(3): 352-5.
- [25] VanDoren MJ, Matthews DB, Janis GC, Grobin AC, Devaud LL, Morrow AL (2000) Neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of ethanol. *J. Neurosci.* 20: 1982-1989.
- [26] Janis GC, Devaud LL, Mitsuyama H, Morrow AL (1998) Effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on the neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in male and female rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22: 2055-2061.
- [27] Martín-García E, Pallares M (2005) Effects of intrahippocampal nicotine and neurosteroid administration on withdrawal in voluntary and chronic alcohol-drinking rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29(9): 1654-1663.
- [28] Gililand-Kaufman KR, Tanchuck MA, Ford MM, Crabbe JC, Beadles-Bohling AS, Snelling C, Mark GP, Finn DA (2008) The neurosteroid environment in the hippocampus exerts bidirectional effects on seizure susceptibility in mice. *Brain Res.* 1243: 113-23.
- [29] Tanchuck MA, Cozzoli DK, He I, Kaufman KR, Snelling C, Crabbe JC, Mark GP, Finn DA (2013) Local changes in neurosteroid levels in the substantia nigra reticulata and the ventral tegmental area alter chronic ethanol withdrawal severity in male withdrawal seizure-prone mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37(5): 784-793.
- [30] Hasirci AS, Maldonado-Devincci AM, Beattie MC, O'Buckley TK, Morrow AL (2017) Cellular GABAergic neuroactive steroid (3 α ,5 α)-3-hydroxy-pregnan-20-one (3 α ,5 α -thp) immunostaining levels are increased in the ventral tegmental area of human alcohol use disorder patients: A postmortem study. *Alcohol Clin Exp Res.* 41(2): 299-311.
- [31] Cook JB1, Dumitru AM, O'Buckley TK, Morrow AL. (2014) Ethanol administration produces divergent changes in GABAergic neuroactive steroid immunohistochemistry in the rat brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 38(1): 90-99.
- [32] Laviola G, Macrì S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27: 19-31.
- [33] Luna B, Marek S, Larsen B, Tervo-Clemmens B, Chahal R (2015) An integrative model of the maturation of cognitive control. *Annu. Rev. Neurosci.* 38: 151-170.
- [34] Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioural manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24: 417-463.
- [35] Spear LP (2015) Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? *Physiol. Behav.* 148: 122-30.
- [36] Melcangi RC, Giatti S, Calabrese D, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, Viviani B, Garcia-Segura LM, Caruso D (2014) Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* 113: 56-69.

- [37] Schumacher M, Mattern C, Ghomari A, Oudinet JP, Liere P, Labombarda F, Sitruk-Ware R, De Nicola AF, Guennoun R (2014) Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors, *Prog. Neurobiol.* 113: 6-39.
- [38] Moran MH, Smith SS (1998) Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain Res.* 807: 84-90.
- [39] Pisu MG, Garau A, Boero G, Biggio F, Pibiri V, Dore R, Locci V, Paci E, Porcu P, Serra M (2016) Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. *Neuroscience.* 320: 172-182.
- [40] Masur J, Oliveira de Souza ML, Zwicker AP (1986) The excitatory effects of ethanol: absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1125-1128
- [41] Blakley G, Pohorecky LA (2006) Psychosocial stress alters ethanol's effect on open field behaviour. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84(1): 51-61.
- [42] Darbra S, Mòdol L, Llidó A, Casas C, Vallée M, Pallarès M (2014) Neonatal allopregnanolone levels alteration: effects on behavior and role of the hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 13: 95-105.
- [43] Smith SS, Gong QH (2005) Neurosteroid administration and withdrawal alter GABAA receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *J Physiol.* 564(Pt 2): 421-36.
- [44] Bitran D, Klibansky DA, Martin GA (2000) The neurosteroid pregnanolone prevents the anxiogenic-like effect of inescapable shock in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 151(1): 31-7.
- [45] Karlsson O, Roman E. Dose-dependent effects of alcohol administration on behavioral profiles in the MCSF test. *Alcohol* 2016; **50**: 51-56
- [46] Gulinello M, Gong QH, Smith SS (2002) Progesterone withdrawal increases the alpha4 subunit of the GABA(A) receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology - a comparison with female rats. *Neuropharmacology* 43(4): 701-14.
- [47] Darbra S, Pallarès M (2010) Alterations in neonatal neurosteroids affect exploration during adolescence and prepulse inhibition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 35(4): 525-35.
- [48] Romeo RD (2016) The impact of stress on the structure of the adolescent brain: Implications for adolescent mental health. *Brain Res.* pii: S0006-8993(16) 30148-2.
- [49] Romeo RD, Bellani R, McEwen BS (2005) Stress-induced progesterone secretion and progesterone receptor immunoreactivity in the paraventricular nucleus are modulated by pubertal development in male rats. *Stress* 8: 265-271.
- [50] Romeo RD (2010) Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. *Front. Neuroendocrinol.* 31: 232-240.
- [51] Darbra S, Modol L, Vallée M, Pallarès M (2013) Neonatal neurosteroid levels are determinant in shaping adult prepulse inhibition response to hippocampal allopregnanolone in rats. *Psychoneuroendocrinology* 38(8): 1397-1406.
- [52] Mihalek RM1, Bowers BJ, Wehner JM, Kralic JE, VanDoren MJ, Morrow AL, Homanics GE (2001) GABA(A)-receptor delta subunit knockout mice have multiple defects in behavioral responses to ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25(12): 1708-1718.
- [53] Nie H1, Rewal M, Gill TM, Ron D, Janak PH (2011) Extrasynaptic delta-containing GABAA receptors in the nucleus accumbens dorsomedial shell contribute to alcohol intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(11): 4459-4464.

- [54] Rewal M, Jurd R, Gill TM, He DY, Ron D, Janak PH (2009) Alpha4-containing GABAA receptors in the nucleus accumbens mediate moderate intake of alcohol. *J. Neurosci.* 29(2): 543-549.
- [55] Rewal M, Donahue R, Gill TM, Nie H, Ron D, Janak PH (2012) Alpha4 subunit-containing GABAA receptors in the accumbens shell contribute to the reinforcing effects of alcohol. *Addict. Biol.* 17(2): 309-321.
- [56] Xiao C, Zhou C, Li K, Ye JH (2007) Presynaptic GABAA receptors facilitate GABAergic transmission to dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of young rats. *J. Physiol.* 580: 731-743.
- [57] Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br. J. Pharmacol.* 154(2): 299-315.
- [58] Follesa P, Biggio F, Caria S, Gorini G, Biggio G (2004) Modulation of GABA(A) receptor gene expression by allopregnanolone and ethanol. *Eur. J. Pharmacol.* 500(1-3): 413-425.
- [59] Sundstrom-Poromaa I, Smith DH, Gong Q, Sabado TN, Li X, Light A, Wiedmann M, Williams K, Smith SS (2002) Hormonally regulated $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA-A receptors are a target for alcohol. *Nat. Neurosci.* 5: 721-722.
- [60] Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature.* 444(7118): 486-489.
- [61] Linsenbardt DN, Boehm 2nd SL (2010) Ethanol-induced locomotor sensitization in DBA/2J mice is associated with alterations in GABA(A) subunit gene expression and behavioral sensitivity to GABA(A) acting drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95(3): 359-366.
- [62] Phillips TJ, Shen EH (1996) Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *Int. Rev. Neurobiol.* 39: 243-282
- [63] Stamatakis A, Pondiki S, Kitraki E, Diamantopoulou A, Panagiotaropoulos T, Raftogianni A, Stylianopoulou F (2008) Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress.* 11(2): 148-59.
- [64] Todeschin AS, Winkelmann-Duarte EC, Jacob MH, Aranda BC, Jacobs S, Fernandes MC, Ribeiro MF, Sanvitto GL, Lucion AB (2009) Effect of neonatal handling on social memory: social interaction and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm. Behav.* 56(1): 93-100.
- [65] Mòdol L, Darbra S, Vallè M, Pallarès M (2013) Alteration of neonatal Allopregnanolone levels affects exploration, anxiety, aversive learning and adult behavioural response to intrahippocampal neurosteroids. *Behav. Brain Res.* 241: 96-104.

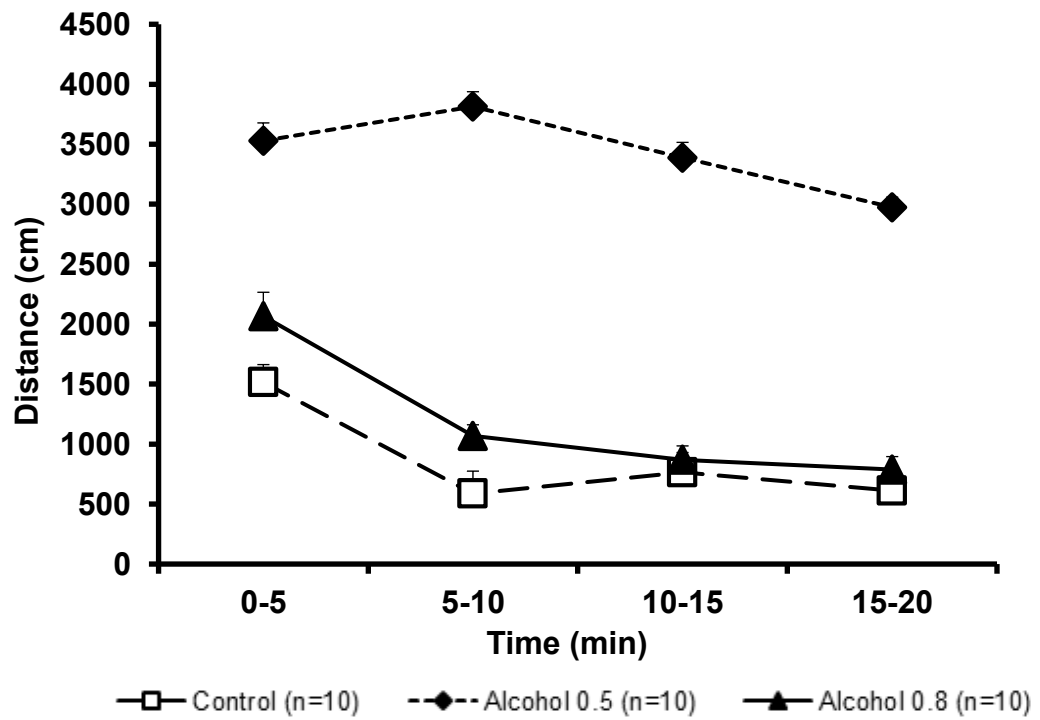


Fig. 1. Locomotor response to alcohol doses. 0.5g/kg of ethanol produced a robust stimulant effect on locomotor behavior (Duncan test: Alcohol 0.5 vs Control and Alcohol 0.8; $p < 0.001$). For more details see text.

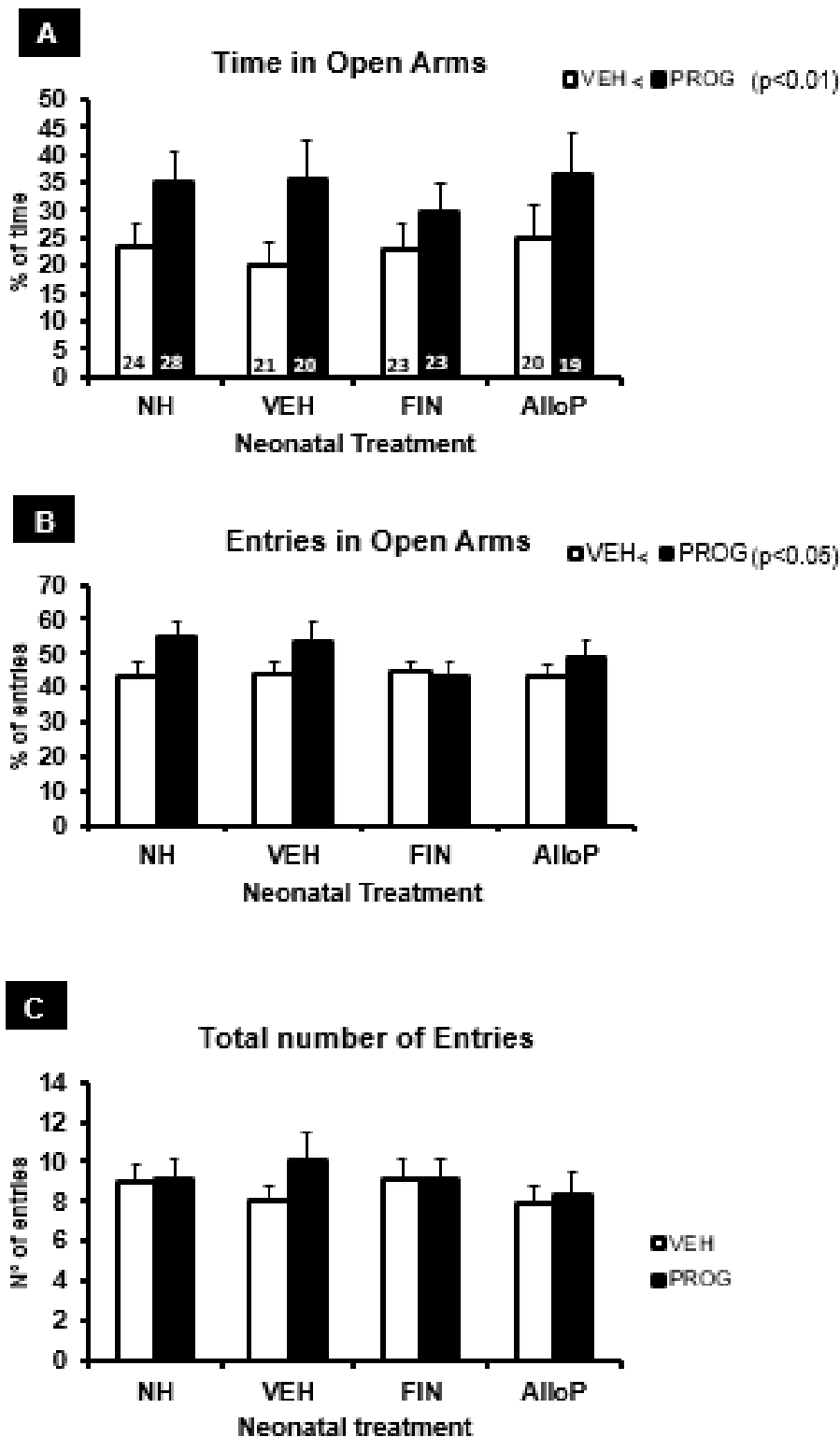


Fig. 2. Adolescent AlloP precursor administration (PROG) induces anxiolytic-like profile in the EPM test. A) Adolescent PROG administration increased open arm time percentage independently of neonatal treatment [$F(1,170)=8.15$; $p<0.01$, $\eta^2=0.89$]. **B)** PROG administration globally increased the percentage of open arms entries [$F(1,170)=3.98$; $p<0.05$, $\eta^2=0.80$]. **C)** Statistically significant differences were not observed in total arm entries [$F(1,170)=0.71$; N.S.]. Numbers in bars indicate group size.

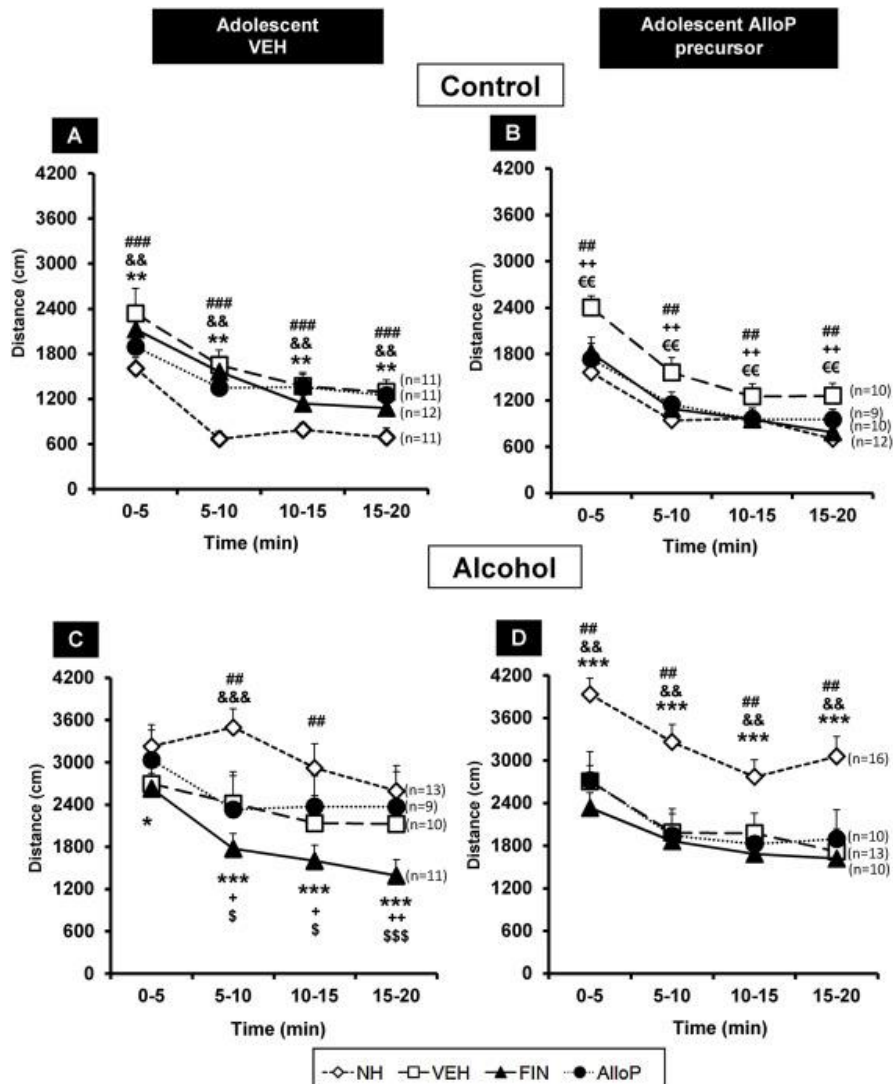


Fig. 3. Neonatal finasteride administration decreases the sensitivity to the locomotor stimulant effects of a low ethanol dose, but differences between treatments are not present after adolescent AlloP precursor administration (PROG). **A)** Neonatal NS manipulation increased locomotor activity [$F(3,41)=5.13$; $p<0.01$, $\eta^2=0.84$]. **B)** PROG administration in adolescence increased locomotor activity only in neonatal VEH-treated rats [$F(3,37)=4.54$; $p<0.01$, $\eta^2=0.82$]. **C)** Neonatal finasteride administration decreased locomotor activity induced by a low ethanol dose [NEO x TIME $F(9,117)=1.86$; $p=0.06$, $\eta^2=0.65$]. **D)** Neonatal finasteride administration effect was not observed when PROG was administered in adolescence [NEO, $F(3,45)=9.77$; $p<0.001$, $\eta^2=0.91$]. Symbols indicate the following differences: # NH vs. VEH; & NH vs. AlloP; * NH vs. finasteride; + finasteride vs. VEH; € AlloP vs. VEH; \$ finasteride vs. AlloP. (One symbol: $p<0.05$; two symbols: $p<0.01$ and three symbols: $p<0.001$). Numbers in parenthesis indicate sample size. For more details see text.

EXPERIMENTO 2

MÉTODOS

Experimento 2

Los resultados del primer experimento indicaron que aquellas ratas tratadas con finasteride durante la etapa postnatal temprana eran menos sensibles a los efectos estimulantes motrices del EtOH. En estudios previos habíamos observado que los animales tratados neonatalmente con finasteride presentaban un mayor consumo inicial de EtOH, junto con una disminución de los niveles de serotonina en el estriado ventral (Llidó et al., 2016a; Llidó et al., 2016b), además de una menor exploración de ambientes nuevos (Darbra y Pallarés, 2010; Mòdol et al., 2013). Sabiendo que presentar un perfil de búsqueda de sensaciones/novedad aumenta la vulnerabilidad al consumo de drogas (Belin et al., 2016), pero considerando que estos rasgos son dissociables (Flagel et al., 2014), y teniendo en cuenta que la serotonina modula las propiedades reforzantes del EtOH (Deehan et al., 2016) a través de la liberación de dopamina mediante la activación del receptor 5-HT3 (Barnes y Sharp, 1999), nos planteamos realizar un segundo experimento para comprobar si la manipulación de los niveles de NAS neonatales afectaba a la preferencia por la novedad además del consumo inicial de EtOH a través de la posible alteración del receptor 5-HT3. Este experimento se dividió en dos fases:

- Experimento 2a:

Se administró allopregnanolona (20mg/kg) o finasteride (50mg/kg) entre PN5-PN9. En la edad adulta (PN70), se realizó la prueba de NOP para valorar la preferencia por la novedad en nuestros animales. Posteriormente (PN77), los

sujetos tuvieron libre acceso a dos botellas (una de EtOH (10%) con glucosa (3%), y otra con glucosa (3%) como solución control) una hora diaria durante dos semanas consecutivas para evaluar el consumo inicial de EtOH. Los animales fueron tratados con el antagonista del receptor 5-HT₃, ondansetron (0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg o vehículo) 30 minutos antes de la hora de consumo. Las administraciones se llevaron a cabo durante el establecimiento del consumo (días 1, 2, 3) y al final del procedimiento (días 11, 12, 13). Se añadió un día de consumo (día 16) dónde se administró una dosis de recuerdo del fármaco ondansetron y, posteriormente, tras la hora de consumo de EtOH los animales fueron sacrificados. Se diseccionó el estriado ventral para su posterior análisis (ver experimento 2b).

- Experimento 2b:

En este experimento, se cuantificó la concentración del receptor 5-HT₃ mediante la técnica de Western Blot en las muestras extraídas en cerebro de rata adulta (ver experimento 2a). También se analizaron muestras de cerebro neonatal. Se administró allopregnanolona (20mg/kg) o finasteride (50mg/kg) entre PN5-PN9 a los animales que fueron sacrificados en los días PN6, PN9, PN12 y PN15. Se diseccionó el mesencéfalo (estructura cerebral donde se encuentra el ATV) para la cuantificación del receptor 5-HT₃.

Protocolo de Western Blot

Para la homogenización de las muestras se utilizó el tampón ya preparado RIPA lysis buffer system (25mM Tris•HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 0.004% azida sódica, 2mM PMSF, 1mM ortovanadato sódico y 1% de cóctel inhibidor de proteasa) (SantaCruz Biotechnologies). Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 16000 rpm durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante, se hicieron alícuotas y se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteínas mediante el kit de ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (Pierce, Estados Unidos). Los niveles del receptor 5-HT3A se determinaron mediante Western Blot. Cada gel contenía muestras representativas de cada tratamiento y cada día de extracción de la muestra. Además, se incluyó un sujeto repetido en cada gel como muestra control de las muestras neonatales. En las muestras de tejido cerebral adulto, se incluyeron dos muestras control y se realizó el promedio en el posterior análisis. Se utilizaron 30µg de proteínas por muestra, se separaron mediante electroforesis en TGX™ Precast Gels 4-15% (Bio-Rad) y se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (Bio-Rad). La transferencia se realizó mediante un equipo de transferencia “semi-seco” (Trans-Blot® Turbo™, Bio-Rad). Una vez realizada la transferencia se lavó la membrana con 25mM Tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5 (TBST, ThermoFisher Scientific), se bloqueó la membrana con 5% de leche desnatada en polvo en TBST. Se utilizaron anticuerpos del receptor 5-HT3A obtenidos en conejo (GTX13897, GeneTex, Irvine, California, Estados Unidos). Se realizó la incubación con el primer anticuerpo diluido en TBST suplementado con 3% de

albúmina sérica bovina (BSA) a 2ug/ml durante 18h a 4°C con agitación. Al día siguiente, se lavó con TBST y se realizó la incubación durante 1h en agitación a temperatura ambiente con anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo marcado con peroxidasa de rábano (1/10000 en 3% BSA en TBST). Posteriormente, se lavó con TBST. Para finalizar, se llevó a cabo la detección con supersignal (Thermo Fisher), 5ml por membrana durante 5min. Se realizó la captura de la imagen con C-Digit (LI-COR; Lincoln, Nebraska, Estados Unidos) y se cuantificaron las bandas mediante el programa Image Studio Lite (LI-COR). La cuantificación se realizó mediante rectángulos del mismo tamaño alrededor de las bandas, y se sustrajo el *background* local para eliminar la señal de fondo. Como control de carga se utilizó la proteína de β -actina. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de la β -actina obtenido en ratón (disolución 1/10000 en 3% BSA en TBST). La densitometría para cada individuo fue relativa a sus valores de beta-actina y los sujetos control.

EXPERIMENTO 2a. “Early postnatal neuroactive steroid manipulation modulates ondansetron effects on initial periods of alcohol consumption in rats

EXPERIMENTO 2b. Efectos de la manipulación postnatal temprana de los niveles de esteroides neuroactivos sobre la expresión del receptor de la serotonina tipo 3 en el mesencéfalo y el estriado ventral

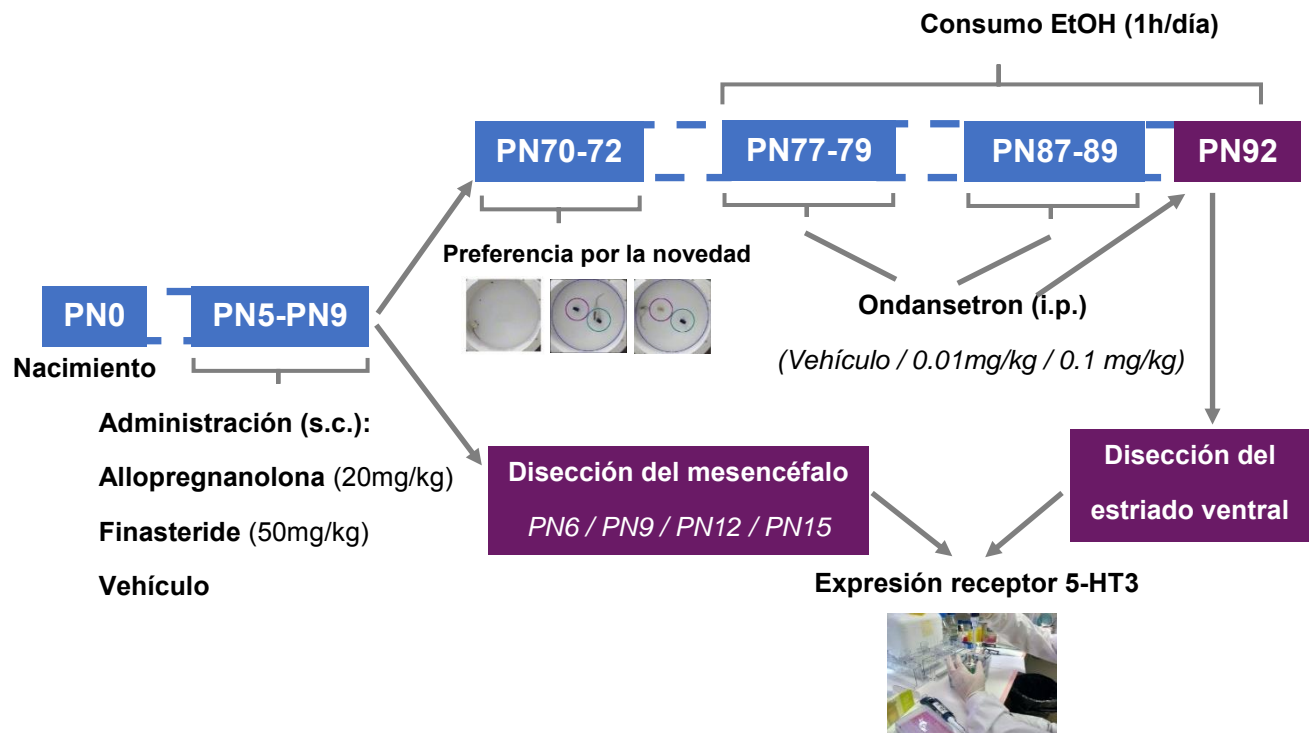


Figura 5. Diseño experimental del experimento 2a (azul) y 2b (violeta)

EXPERIMENTO 2a. RESULTADOS

Publicado en forma final editado por *Physiol Behav.* 2018 Oct 1;194:371-379. doi:10.1016/j.physbeh.2018.06.031

Early postnatal neuroactive steroid manipulation modulates ondansetron effects on initial periods of alcohol consumption in rats

Bartolomé I., Llidó A., Darbra S., Pallarès M.

ABSTRACT

Neuroactive steroids (NS) such as allopregnanolone are crucial for brain development and adult behaviour. Early post-natal alterations of NS by administering finasteride induce a decrease in the sensitivity to stimulant effects of low alcohol doses, an increase in alcohol consumption, and a decrease in ventrostriatal dopamine and serotonin levels. The aim of the present study is to observe if the effects of the 5HT3 receptor antagonist ondansetron on initial alcohol consumption are modulated by post-natal NS manipulation. For this purpose, allopregnanolone, finasteride, or vehicle was injected from day 5 to 9. In adulthood, a novel object preference test was carried out in order to detect a possible novelty-seeking pattern in our animals, which has been related to vulnerability to drug abuse. The subjects then had access to two bottles (alcohol or control solutions) one hour daily for two consecutive weeks. Ondansetron (0.01mg/kg, 0.1mg/kg or vehicle) was administered before the hour of consumption in the initial phase (days 1, 2, 3) of the procedure, and after prolonged alcohol intake (days 11, 12, 13). Results indicated that finasteride animals showed a higher preference to explore the new object, as well as a higher alcohol consumption than the rest of the groups. Moreover, 0.1mg/kg of ondansetron decreased alcohol consumption, but only in the post-natal finasteride group, suggesting a possible increase in 5HT3 receptor sensitivity in these animals. In conclusion, NS manipulation in crucial stages of development, such as early post-natal periods, seems to play an important role on the effects of ondansetron on alcohol intake and in the vulnerability to develop drug use or abuse.

Keywords: Neuroactive steroids, Novelty-seeking, Ondansetron, Development, Alcohol intake

1. INTRODUCTION

Neuroactive steroids (NS) can alter neuronal activity regardless of its origin (adrenal, gonadal, or cerebral) [1,2]. One of the most important mechanisms of action of the NS in the central nervous system is the allosteric modulation of the ionotropic receptors, such as GABAA, 5HT3 serotonin, or nicotinic acetylcholine receptors [3,4,5].

It has been observed that NS, acting as positive or negative GABAA modulators, are essential for brain development. In this way, it has been described that an increase in the positive GABAA modulator allopregnanolone (AlloP) during post-natal periods affects the thalamic-cortical pathways development [6]. Furthermore, the administration of negative GABAA modulators, such as pregnenolone or dehydroepiandrosterone, in early stages of development changes the activity of dopamine (DA) in the striatum [7]. On the other hand, finasteride, a 5 α -reductase inhibitor (enzyme involved in the synthesis of AlloP, tetrahydrodeoxycorticosterone, and dihydrotestosterone [8]), has been used as a tool to manipulate endogenous levels of NS that are positive modulators of GABAA receptors. Thus, it has been documented that early post-natal administrations of finasteride affect the expression of GABAA alpha4 and delta receptor subunits in the hippocampus [9].

Furthermore, several studies have reported that post-natal NS alterations can modify adult behaviour (for a review see [10]). For example, it has been observed that early post-natal administration of AlloP increased locomotor activity in a novel environment and reduced the anxiolytic-like effects of the benzodiazepine lorazepam [11], decreased anxiety in the elevated plus-maze (EPM) test [12,13], and increased activity induced by amphetamine administration [14]. A number of these behavioural traits related to AlloP administration (i.e. increase in novelty exploration and anxiety decrease) have been linked to a sensation/novelty seeking pattern, which at the same time has been related to a vulnerability to use and abuse of several drugs, including alcohol [15,16,17]. In previous experiments it was observed that post-natal NS manipulation by means of finasteride administration increased voluntary consumption of an ethanol (EtOH) solution in a 1 hour/day limited access procedure [18,19], decreased ventrostriatal DA and serotonin levels [18], and decreased DA release in the nucleus accumbens after EtOH or food presentation [19]. These last results suggest a possible hypo-dopaminergic activity related to early post-natal finasteride administration that could have induced an increase in alcohol consumption. Moreover, it has been documented that DA inhibition seems to produce a decrease in the sensitivity to EtOH stimulating effects [20]. Consistent with this last data, we have recently reported that early post-natal finasteride administration decreased locomotor activity induced by a low dose of EtOH [21].

Interestingly, it has been reported that AlloP brain levels increase after the administration of EtOH [22,23,24,25], although there are sexual [26] and species [27] differences in this effect. Furthermore, part of the EtOH behavioural effects may be related to the increase in endogenous AlloP levels. Thus, it has been found that a pre-treatment with finasteride attenuates the anxiolytic action of EtOH [28]. Moreover, the development of tolerance to the depressing effects of EtOH is linked to a reduction in AlloP production [23,29]. On the other hand, the administration of AlloP also affects the EtOH consumption, producing an increase in intake in non-dependent rats with low consumption levels [23,30]. Furthermore, systemic AlloP administration decreases alcohol intake in dependent rats with high consumption levels [23], including when AlloP is administered into the dorsal hippocampus [31]. In this way, it has been observed, in mice, that low doses of AlloP (i.p. and i.c.v.) increase EtOH intake, whereas high doses of AlloP decrease it in limited

access EtOH drinking [32], and in the EtOH operant self-administration paradigm [33]. Moreover, it has been observed that intrahippocampal AlloP administration reduces EtOH withdrawal symptoms, such as audiogenic seizures and body rigidity [34], while finasteride increases their severity [35].

Both alcohol and AlloP modulate 5HT₃ receptors. Whilst alcohol acts as a positive allosteric modulator of this receptor [36], AlloP acts as negative modulator [5]. Of importance, is that 5HT₃ receptor seems to be related to the alcohol rewarding properties throughout the modulation of DA release in the nucleus accumbens [37,38,39,40]. For this reason, it has been proposed that differences in serotonergic signalling may participate in alcoholism vulnerability [41,42]. The systemic administration of 5HT₃ receptor antagonists has been shown to effectively reduce alcohol intake in rats in free-choice conditions [43,44,45,46]. However, although their efficacy is variable depending on drinking conditions after stabilization of ethanol intake [45], there are no studies focusing on their possible effects in the initial periods of alcohol intake, which can be important for the later development of drug abuse. On the other hand, it has been hypothesised that 5HT₃ receptors are potential key-regulators of network formation and function in the developing brain [47]. Given that NS are modulators of 5HT₃ receptors at micromolar concentrations [5], its maturation could be affected by post-natal NS manipulation, and consequently, alcohol rewarding properties could be modified. It should be mentioned that previous experiments carried out in our laboratory reported hippocampal levels of AlloP in the micromolar range in PN5 [48] and PN9 [49] after post-natal injections of 20mg/kg of AlloP. Moreover, although finasteride administration during the neonatal period affects the expression of some GABA_A receptors in adult age [9], it is not known how it may affect neuroactive steroids levels in adult animals. Thus, it is important to consider that finasteride, by inhibiting the 5 α -reductase enzyme, affects levels of all the 5- α -reduced neuroactive steroids, not only those of AlloP.

The aim of the present study is to determine whether the effects of the pharmacological antagonism of the serotonin 5HT₃ receptor on initial alcohol intake would be affected by post-natal NS manipulation. For this purpose, AlloP, finasteride or vehicle was administered to newborn male Wistar rats. In adulthood, the animals were subjected to one hour per day of EtOH intake for two weeks, and were administered with the 5HT₃ antagonist, ondansetron, on days 1-2-3 and 11-12-13 of alcohol intake days. Moreover, as novelty seeking (preference for a novel environment in a free-choice situation) has been shown to be a predictor of substance use disorder outcomes in animals and humans [50,51,52], including the risk for the initiation of drug use [53], we decided to investigate the possible effects of post-natal treatments on novelty-seeking that could be linked to posterior alcohol use/abuse vulnerability. As used in previous works [54,55,56], the novelty object preference (NOP) test was chosen as a behavioural test of free-choice novelty-seeking. The NOP task is based on rodents' natural tendency to explore novel objects and provides subjects with the opportunity to choose between a novel and a familiar stimulus [57,58]. Although NOP has been frequently used for memory testing, the NOP task also allows researchers to investigate the mechanisms involved in novelty seeking [57,58,59]. For

instance, it has been suggested that acute stress decreases NOP probably by inducing an emotional arousing state which motivates novelty avoidance, and not through a memory retrieval impairment [60]. Moreover, spontaneous high impulsivity rats, which have a high vulnerability to cocaine abuse, showed a general preference for novel objects or contexts in comparison to familiar ones [61].

In the present experiment, we hypothesised that early post-natal NS alteration will affect novelty-seeking behaviour, as well as the effects of ondansetron on EtOH intake, and will be different depending on post-natal NS manipulation, suggesting an altered 5HT₃ receptor function.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

106 male Wistar rats were bred in the Laboratory of Psychobiology (Autonomous University of Barcelona), and housed in a temperature-controlled animal room (22-24°C) on 12h light/dark cycle (lights on at 8:00H) on a food and water *ad libitum*. The day of birth (post-natal day (PN) 0) was strictly controlled and the litters were reduced to 10 pups. In order to avoid any effect of cohorts, each litter of the same parents was assigned to different post-natal treatments (AlloP, finasteride or vehicle) (detailed below). After weaning (PN 21) males were separated into groups of siblings with a maximum of four and a minimum of two animals per cage (46.5 x 21.5 x 19.5 cm) and females were sacrificed. At PN75 the animals were housed individually, two days before starting alcohol consumption procedure. No visible animal health alterations were detected during development as a consequence of the post-natal treatments or during behavioural evaluations. All animals were obtained, housed, and sacrificed in accordance with the protocol approved by the Committee of the Autonomous University of Barcelona for Care and Use of Experimental Animals and the Department of Environment from Generalitat de Catalunya. This protocol follows the guidelines approved by the European Council Directive (2010/63/EU).

2.2. Early post-natal Treatment

Pups were injected (s.c.) with AlloP (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, 20 mg/kg), finasteride (N-tert-Butyl-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-ene-17 β -carboxamide, 50 mg/kg) or vehicle (10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin dissolved in distilled water), once a day from the post-natal day 5 to 9 (PN5-PN9). AlloP and finasteride were dissolved in distilled water and 10% 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. The doses were chosen based on previous experiments which show that they were effective in changing behaviour in adulthood (for a review see [10]). For injections, each litter was removed from progenitors and returned to its cage in less than 12 minutes. The chemicals were obtained from Sigma (Deisenhofen, Germany).

2.3. Adult Treatment

Subjects were administered (i.p.) with the 5HT₃ antagonist ondansetron (ondansetron hydrochloride dehydrate (C₁₈H₁₉N₃O·HCl·2H₂O) obtained from Sigma), and were randomly

divided into three groups: 0.01mg/kg, 0.1mg/kg or vehicle (saline solution (0.9% NaCl)). The doses were chosen as they were effective to decrease alcohol intake [62] or to reduce DA efflux enhanced by morphine and haloperidol [63] in previous works. The administration took place 30 minutes before solutions presentation on days 1, 2, 3 and 11, 12, 13, at the beginning of the initial and final phases of alcohol consumption (see section 2.5.).

2.4. Novelty-seeking test

In adulthood (PN70), novel object recognition was measured in an open-field apparatus, which consisted of a circular arena (81.5 cm diameter) enclosed by a wall 31.5 cm high. The open field was located in a separate room lit illuminated by a dim light (average 36 lx). NOP was carried out in three separated days, as has been previously reported [58,64,65]: (1) habituation to the apparatus (two separated sessions of 15 minutes) (Habituation trial); (2) one session of 10 minutes to explore two identical objects (Sample trial); and (3) one session of 10 minutes to explore 2 different objects (one familiar and one new) (Test trial). The objects were Lego Duplo constructions (one was yellow in “L” shape and the other was dark-blue in “T” shape), which were randomly assigned to each subject. The objects were attached with Velcro to the floor at a distance of 27 cm from the wall of the open-field and 27 cm away from each other. The position (right/left) of the novel object in the third day was counterbalanced for each subject. The animals were individually placed faced to the wall at the beginning of the test. After each trial, the apparatus and the objects were cleaned with an aqueous solution containing EtOH (20% v/v) to prevent olfactory cues. The number of contacts and time the animal made, whether touch, sniff or nibble (around 1cm from the object) were monitored and manually recorded always by the same investigator placed in an adjacent room. To ensure that the training experience was matched for all rats, the subjects that not presented a minimum of 20 seconds of exploration of each object in sample trial were not included in the study. In addition, small areas (11.5 cm diameter) were delimited around the objects in order to automatically register number of entries in the object area and time spent within the object area by means of an activity monitoring system (SMART, Letica, Barcelona, Spain). This system is based on automated image analysis in real time, recorded by a video camera that is suspended from the ceiling over the apparatus. We decided to include this automatic recordings in order to obtain additional information as we have previously reported that post-natal finasteride administration induced a decrease in the exploratory behaviour using the Boissier test during adolescence and adulthood [48,66], and this effect on exploration could confound the interpretation of the results.

In order to analyse the novel object preference, the following formulas was used:

$$\text{Preference for novel object} = (\text{novel object} / (\text{novel object} + \text{old object})) \times 100$$

This formula was applied to the 4 variables recorded: number of contacts, time of exploration, number of entries in the object area and time spent in the object area.

2.5. Alcohol consumption

The procedure of alcohol consumption consisted on 1h per day (15:00-16:00 h) limited access to two plastic bottles (with a safety valve that prevented spillage and evaporation): (a) a solution of 10% (v/v) EtOH + 3% (w/v) glucose in distilled water; and (b) a solution of 3% (w/v) glucose in distilled water, during 15 consecutive days, starting at PN77. Variations of this procedure have been previously used by our group [18,19,31,34]. EtOH solution was prepared using EtOH absolute (synthesis grade 99.9%) from Scharlab (Barcelona, Spain). The glucose used was D(+)- glucose anhydrous from Panreac (Barcelona, Spain). In order to adaptation to the new condition, animals were housed individually two days before starting the alcohol consumption. The food was retired in the beginning of the procedure and the subjects remained with daily food restriction (5g per day administered together with the two bottles). We used food restriction (1) to compare with previous experiments from our laboratory that used the same procedure [18,19] and (2) to increase drug-seeking and drug reward magnitude [67,68]. A daily weight control of the animals was done before starting the alcohol and food intake in order to control weight loss; additional food was administered when was needed (this ration was adjusted in order to avoid that animals lose >15% of their initial weight). Glucose was added to avoid alcohol taste aversion, as used in previous experiments [18,19,31,34]. Bottles position was counterbalanced every day to avoid a possible bias. Bottles were weighted every day before and after its presentation with the purpose of determine the dose consumed. For the rest of the day, animals had *ad libitum* access to water. Grams of EtOH or grams of glucose were divided by kilograms of body weight to calculate the EtOH and glucose doses daily consumed. For daily EtOH solution preference the following formula was used:

$$\text{Preference for EtOH solution} = (\text{EtOH solution consumed} / (\text{EtOH solution consumed} + \text{glucose solution consumed})) \times 100$$

Based in previous studies [18,19,31,34], we considered an initial phase of alcohol consumption of ten days to assure consistent alcohol consumption levels, and a final phase of alcohol consumption (the last five days). Thus, ondansetron was injected in the first three days of each phase (see section 2.3).

2.6. Statistical Analysis

Data analysis was conducted by STATISTICA software (StatSoft, Tulsa, USA). Preference for novel object in the NOP test was analysed by means of an ANOVA with PNAT (post-natal treatment) as between-groups factor (three levels: VEH, AlloP, FIN). Three-way ANOVAs were used in order to analyse the dose (g/kg) of EtOH or glucose consumption, with PNAT, OND (adult treatment, 3 levels: control, ondansetron low dose, ondansetron high dose), and TIME as intra-subjects factor (15 levels, one per day). In resulting ANOVA partitions, TIME was subsequently divided according to adult ondansetron administrations: the first 10 days in order to analyze the possible effects of the injections made at the initial phase of consumption

(days 1, 2 and 3); and the last 5 days in order to study possible alterations related to injections made at the final phase (days 11, 12 and 13). Post-hoc Duncan tests were performed when needed. Data are shown as mean \pm SEM. Partial eta squared (η^2) has been included in order to provide effect size estimations.

3. RESULTS

3.1. Novel object preference

3.1.1. Sample trial

In the sample trial of novel object recognition test (habituation to two identical objects), there were no statistical differences between the time of exploration of the right and the left object in control post-natal vehicle ($t=1.4$; N.S.), AlloP ($t=0.85$; N.S.) and finasteride ($t=1.62$; N.S.) groups. Thus, the two identical objects elicit equal amounts of exploration in all experimental groups. Moreover, ANOVA showed that there were no statistical differences between post-natal treatment groups in the time spent exploring the objects [$F(2,103)=1.24$; N.S.; VEH: 45.67 ± 6.09 ; AlloP: 58.62 ± 7.15 ; Finasteride: 46.56 ± 5.81] nor in the number of contacts [$F(2,103)=1.34$; N.S.; VEH: 12 ± 1.36 ; AlloP: 15.28 ± 1.46 ; Finasteride: 13.21 ± 1.44], and neither in the total time spent in the object areas [$F(2,103)=0.52$; N.S.; VEH: 46.2 ± 14.38 ; AlloP: 46.02 ± 6.33 ; Finasteride: 32.26 ± 5.78] or in the total of area entries [$F(2,103)=1.68$; N.S.; VEH: 18.34 ± 2.49 ; AlloP: 25.37 ± 3.15 ; Finasteride: 19.21 ± 3.1].

3.1.2. Test trial

Regarding to the original recorded variables, a significant PNAT effect in time spent exploring the old object [$F(2,103)=4.21$; $p<0.05$, $\eta^2=0.81$] was found, showing finasteride group the lowest levels of exploration (see Table 1). Results showed no effects in the time of exploration of the novel object [$F(2,103)=1.53$; N.S.]. It was also found a significant PNAT effect in the old object contacts [$F(2,103)=5.01$; $p<0.01$, $\eta^2=0.83$], presenting also finasteride animals the lowest levels of exploration (see Table 1). Moreover, differences between groups in the novel object contacts just fail to reach statistical significance [$F(2,103)=2.54$; $p=0.08$, $\eta^2=0.72$]. Similar effects of finasteride group were observed in the automatic recorded variables: Time spent in the old object [$F(2,103)=7.91$; $p<0.001$, $\eta^2=0.89$] and novel object areas [$F(2,103)=2.72$; $p=0.07$, $\eta^2=0.73$], and entries in the old object area [$F(2,103)=3.62$; $p<0.05$, $\eta^2=0.78$] but not in the novel object area [$F(2,103)=1.36$; N.S.]. See Table 1 for mean values and individual comparisons.

In the novel object exploration preference, ANOVA showed a significant PNAT effect in time [$F(2,103)=3.19$; $p<0.05$, $\eta^2=0.76$], contacts [$F(2,103)=3.09$; $p<0.05$, $\eta^2=0.76$], time spent in the area [$F(2,103)=4.13$; $p<0.05$, $\eta^2=0.81$] and area entries [$F(2,103)=5.56$; $p<0.01$, $\eta^2=0.84$]. Subsequent post-hoc Duncan tests indicated that finasteride animals showed higher preference to explore the novel object than the other groups, in time of exploration as well as in contacts (see Figure 1). Furthermore, finasteride group also presented higher preference in time expended in the novel object area compared to AlloP ($p<0.01$) but differences just fail to reach statistical

significance compared to vehicle group ($p=0.08$). Finasteride group also showed a greater preference for entry to the novel object area compared to the other post-natal groups (differences between groups are detailed in Figure 1).

3.2. EtOH intake

3.2.1. Dose of EtOH consumed

Regarding the dose of EtOH consumed by the animals, the mixed three-way ANOVA showed a significant effect of PNAT [$F(2,97)=4.99$; $p<0.01$, $\eta^2=0.83$] and TIME factors [$F(14,1358)=32.69$; $p<0.001$, $\eta^2=0.97$], and a significant interaction between PNAT x TIME [$F(28,1358)=1.98$; $p<0.01$, $\eta^2=0.66$]. This significant interaction indicates that effects of post-natal manipulations in EtOH intake were different depending on time period. Therefore, a partition in TIME factor was made splitting up the first 10 days and the last 5 days, according to the pattern of ondansetron administration (see 2.6. section).

In the first 10 days of EtOH consumption, statistical analysis indicated that there were significant effects of PNAT [$F(2,97)=5.46$; $p<0.01$, $\eta^2=0.84$], OND [$F(2,97)=3.28$; $p<0.05$, $\eta^2=0.77$] and TIME [$F(9,873)=30.56$; $p<0.001$, $\eta^2=0.97$] along with a significant interaction between these factors (PNAT x OND x TIME: $F(36,873)=1.54$; $p<0.05$, $\eta^2=0.61$). The subsequent analysis split up by OND factor showed a significant effect of PNAT [$F(2,31)=3.29$; $p=0.05$, $\eta^2=0.77$], TIME [$F(9,279)=10.26$; $p<0.001$, $\eta^2=0.91$] and also an interaction between PNAT x TIME [$F(18,279)=2.43$; $p<0.001$, $\eta^2=0.71$] in ondansetron control group. Subsequent analysis indicated that finasteride group consumed higher doses of EtOH than the other groups from day 6 (see Figure 2A for post-hoc comparisons). In the animals administered with low doses of ondansetron, although differences in PNAT just failed to reach statistical significance [$F(2,33)=2.94$, $p=0.06$, $\eta^2=0.75$], significant effects of TIME [$F(9,279)=13.63$, $p<0.001$, $\eta^2=0.93$] and PNAT x TIME [$F(18,279)=1.89$, $p<0.05$, $\eta^2=0.65$] factors were observed. Subsequent Post-hoc Duncan test indicated that vehicle and finasteride treated-animals consumed higher dose of EtOH than AlloP from day 5 to day 9 (see Figure 2B for daily comparisons), and there were no differences between finasteride and vehicle groups. When ondansetron was administered at high doses, it was also observed a significant PNAT [$F(2,33)=3.91$; $p<0.05$, $\eta^2=0.80$] and TIME [$F(9,279)=7.67$; $p<0.001$, $\eta^2=0.88$] effect, along with a significant interaction between PNAT x TIME [$F(18,279)=2.66$; $p<0.001$, $\eta^2=0.73$]. Subsequent post-hoc analysis showed lower levels of alcohol consumption in finasteride and AlloP animals than in control vehicle group from day 7 to day 10 (see Figure 2C). Thus, there were no significant differences between groups in the days of ondansetron administration (days 1, 2 and 3).

Regarding the EtOH consumption in the last five days, only PNAT [$F(2,97)=3.12$; $p<0.05$, $\eta^2=0.76$] and TIME [$F(4,388)=6.18$; $p<0.001$, $\eta^2=0.86$] effects were found. Post-hoc Duncan tests indicated that AlloP treated-animals consumed lower dose of EtOH than the rest of the groups (see Figure 2D for mean values and comparisons). TIME effect indicated that EtOH consumption (mean of all experimental groups) increased across the 5 days [Post-hoc Duncan test: Day11<Day15 ($p<0.001$)].

On the other hand, a complementary analysis split up by PNAT factor in the first 10 days showed that high ondansetron dose decreases alcohol consumption compared to low and control ondansetron only in post-natal finasteride treated rats (OND: $F(2,32)=3.5$, $p<0.05$, $\eta^2=0.78$; TIME: $F(9,288)=14.56$, $p<0.001$, $\eta^2=0.94$; OND x TIME: $F(18,288)=2.42$, $p<0.01$, $\eta^2=0.71$; see Figure 3 for post-hoc daily comparisons). Instead, there were no differences in alcohol intake between ondansetron groups in either post-natal AlloP (OND $F(2,29)=0.15$, N.S.; OND x TIME: $F(18,261)=0.42$, NS) or VEH (OND $F(2,36)=1.68$, N.S.; OND x TIME: $F(18,324)=0.98$, N.S.) groups. Only a significant effect on TIME evolution was observed (AlloP: $F(9,261)=4.12$, $p<0.001$, $\eta^2=0.80$; VEH: $F(9,324)=15.18$, $p<0.001$, $\eta^2=0.94$) indicating that alcohol intake increased across days in these groups.

3.2.2. Dose of glucose consumed

There were no significant effects of PNAT [$F(2,97)=0.64$; N.S.] and OND [$F(2,97)=0.31$; N.S.] factors, neither of the PNAT x OND x TIME interaction [$F(56,1358)=0.72$; N.S.]. Results showed a significant effect of TIME factor [$F(14,1358)=47.28$; $p<0.001$, $\eta^2=0.98$] and PNAT x TIME interaction [$F(28,1358)=2.06$; $p<0.001$, $\eta^2=0.67$]. Therefore, as in alcohol doses analysis, a partition by TIME factor was made. In the first 10 days there was a significant effect of TIME factor [$F(9,873)=49.08$; $p<0.001$, $\eta^2=0.98$], and PNAT x TIME interaction [$F(18,873)=2.17$; $p<0.01$, $\eta^2=0.68$] showing higher doses of glucose consumption in AlloP-treated animals compared to vehicle group, regardless of ondansetron treatment, in days 8, 9 and 10 (see Figure 4A for individual comparisons). Regarding the glucose dose consumed in the last five days, a significant effect of TIME factor [$F(4,388)=4.07$; $p<0.01$, $\eta^2=0.80$] was observed, indicating an increase of glucose consumption across days in all experimental groups. Moreover, the interaction PNAT x OND x TIME just failed to reach statistical significance [$F(16,388)=1.60$; $p=0.07$, $\eta^2=0.62$].

(n=11)

(n=12)

3.2.3. EtOH solution preference

Firstly, we analyzed the total fluid intake and there were no statistically significant effects of PNAT [$F(2,97)=0.15$; N.S.], OND [$F(2,97)=1.26$; N.S.] or its interaction [$F(4,97)=0.16$; N.S.]. There was a significant effect of the TIME factor [$F(14,1358)=78.89$; $p<0.001$], but TIME x PNAT [$F(28,1358)=1.17$; N.S.], TIME x OND [$F(4,97)=1.16$; N.S.] or TIME x PNAT x OND [$F(56,1358)=0.58$; N.S.] interactions were no significant. These results indicated that there were no differences between groups in the total fluid intake, which increased across days in the same way in all the experimental groups.

Relating to EtOH preference, a tendency to significance in PNAT [$F(2,97)=2.64$; $p=0.08$, $\eta^2=0.73$], and significant effects of TIME [$F(14,1358)=2.51$; $p=0.001$, $\eta^2=0.72$] and PNAT x TIME factors [$F(28,1358)=1.49$; $p<0.05$, $\eta^2=0.60$] was observed. This significant interaction indicates that the effects of post-natal manipulations on EtOH preference were different depending on time period. Therefore, the same TIME factor partition was made as in previous analyses. In the first 10 days, there were a tendency to significance in PNAT [$F(2,97)=2.75$; $p=0.07$, $\eta^2=0.73$] and significant effects of TIME factor [$F(9,873)=2.73$; $p<0.01$, $\eta^2=0.73$] and PNAT x TIME interaction

[$F(18,873)=2.22$; $p<0.01$, $\eta^2=0.69$]. Post-hoc analyses indicated that, independently of ondansetron administrations, AlloP animals presented lower alcohol preference than the other two groups in the days 1 (FIN<VEH: $p<0.05$), 6 (AlloP<VEH: $p<0.05$; AlloP<FIN: $p<0.05$), 7 (AlloP<VEH: $p<0.05$), 8 (AlloP<VEH: $p<0.01$; AlloP<FIN: $p<0.001$), 9 (AlloP<VEH: $p<0.05$) and 10 (AlloP<VEH: $p<0.001$; FIN<VEH: $p<0.05$).

In the last five days of consumption, there was no differences in alcohol preference between post-natal groups (PNAT: $F(2,97)=1.51$; N.S.; TIME: $F(4,388)=0.69$; N.S.; PNAT x TIME: $F(8,388)=0.13$; N.S.).

4. DISCUSSION

The results of preference for a novel object indicate that early post-natal finasteride administration increased novelty-seeking preference in adult age. Even so, although finasteride animals had a preference for exploring the new object rather than the familiar one, they generally had lower exploration levels than the other groups (see Table 1). Low exploration levels in finasteride post-natal treated rats have been obtained in previous studies carried out in our laboratory in a different exploration test. In particular, it was observed that post-natal finasteride administration induced a decrease in the head-dipping exploratory behaviour when using the Boissier test during adolescence (at 40 and 60 days of age) [66] and in adulthood [48]. Thus, the present results indicate a differential effect of post-natal finasteride on exploration levels (decrease) and preference for novel objects (increase). On the other hand, as discussed further on, finasteride treated animals obtained the highest levels of alcohol intake compared to other groups. Given that novelty-seeking behaviours have been linked to drug abuse [15,16,17], the reported increase in alcohol consumption in the finasteride group could be related to an increase in the novelty-seeking behaviour. It was previously reported that a high novelty-seeking trait predicts both a propensity to compulsive psychostimulant drug use and the severity of drug addiction-like behaviour (for review see [16]).

The main data of the present experiment shows that the effect of ondansetron on EtOH intake differs depending on the post-natal treatment. The higher tested dose of ondansetron decreased the consumption of alcohol, but only in the animals that consumed the higher alcohol doses, which were the ones that received post-natal finasteride administrations. This increase in alcohol consumption in an alcohol and food limited-access procedure (1 hour) has been previously reported in our laboratory in rats post-natally treated with finasteride [18,19]. However, new studies are needed to extend these results to free food models of alcohol consumption. In any case, this is the first time that a modulation of this finasteride effect on alcohol consumption by means of a 5HT3 antagonist administration has been observed. On the other hand, ondansetron did not reduce the consumption of alcohol in the post-natal vehicle group. Thus, ondansetron administration had no effects on initial alcohol consumption. It seems that 5HT3 antagonists could be effective or ineffective depending on their doses, the alcohol drinking conditions, the duration of drug treatment, or the sex and strain of the animals [45,69,70,71]. In

our experiment, ondansetron was only effective at the higher tested dose, and although it did not affect alcohol consumption in controls, it reduced EtOH intake of finasteride rats. Thus, it could be deduced that 5HT3 receptors work differently in these animals as a consequence of the post-natal treatment with finasteride, making them more sensitive to ondansetron. Moreover, it is important to keep in mind that these receptors participate in neurodevelopment. In fact, 5HT3 receptors could be regulating the brain function and network formation during development [47]. These receptors have been located in the immature basal telencephalon, where neocortical GABAergic interneurons will be generated [47]. 5HT3 receptors are expressed in several types of neurons, including GABAergic interneurons in the neocortex and limbic system, which are crucial for controlling physiological functions of the brain, such as the inhibition of neuronal excitability [47]. Furthermore, 5HT3 receptors *in vitro* modulate the activity of DA neurons in the ventral tegmental area (VTA) [37], and it has been observed that 0.1mg/kg ondansetron reduced morphine-induced DA release in the nucleus accumbens in rats [63]. Thus, a decrease in the activation of this receptor via ondansetron administration could be related to changes in drug-inducing DA release in the nucleus accumbens, which at the same time could be associated with changes in alcohol consumption. In previous studies by our group, it has been observed that the early post-natal finasteride treated animals, which showed higher levels of EtOH consumption, also showed lower levels of the ventrostriatal DA and serotonin [18], as well as DA release in nucleus accumbens after alcohol or food presentation [19] compared to controls. Therefore, the present experiment suggests that these effects could be mediated, at least in part, by alterations in 5HT3 receptors during development induced by finasteride administration. However, molecular experiments are needed to confirm this assertion.

On the other hand, ondansetron had no effects on alcohol consumption on those specific days when the three first injections were made. This lack of ondansetron effects could be related to the very low levels of consumption observed in the initial phase of the procedure. However, the consumption levels remain low in finasteride animals treated with 0.1mg/kg of ondansetron during the days following its administration, compared to the control and ondansetron at low dose groups (see Figure 3). The rewarding properties of alcohol are relevant for the establishment of its consumption in initial stages. In this way, ondansetron could be affecting the alcohol gratification effect during the three injection days by the reduction of DA levels in the nucleus accumbens via 5HT3 receptors antagonism [46,71,72]. Therefore, this effect could be reflected in the subsequent daily consumption, and especially in finasteride treated animals if they showed an increased sensitivity to 5HT3 receptors. In this way, finasteride administration in crucial stages of development inhibits the enzyme 5 α -reductase that participates in the synthesis of 5- α -reduced neuroactive steroids, including AlloP, a negative modulator of the 5HT3 receptor [1,5]. On the other hand, and related to ondansetron injections on days 11, 12 and 13, a decrease in alcohol intake from the day prior to the injection (day 10) was observed in the animals with higher consumption levels, although differences did not reach statistical significance: day 10 versus day 11 in post-natal vehicle treated with high ondansetron dose ($p=0.07$, see Figure 2C), or day 10 versus day 13 in post-natal vehicle treated with low ondansetron dose ($p=0.06$, see Figure 2B).

Although it has been documented that the administration of ondansetron (0.01 and 0.1 mg/kg) reduced EtOH intake in male Wistar rats [62] and attenuated alcohol seeking reinstatement induced by foot shock [73], these doses have been shown to be ineffective in other studies [71,74] (for a review see [75]). Moreover, as previously discussed (see above), different factors, including dosage, could be affecting the efficacy of ondansetron. Thus, higher doses of ondansetron would be needed to test its effects on alcohol intake reduction when it is administered on days 11, 12 and 13.

As regards the preference for alcohol consumption, animals treated in the post-natal period with AlloP showed a lower preference for alcohol consumption compared to other groups. The low alcohol preference in the AlloP group is related to its lower EtOH, and higher glucose, solution consumption (in all ondansetron groups). It should be noted that there were no differences between groups in the total fluid intake, thus differences in preference between AlloP subjects and the rest of the groups were not related to a general decrease in fluid intake. In finasteride treated animals, no differences were observed in EtOH solution preference compared to post-natal vehicle group, as obtained in previous experiments [18]. Finasteride animals had high levels of alcohol consumption in the ondansetron control or 0.01mg/kg groups (see Figures 2A and 2B), but they also had higher consumption levels of glucose solutions compared to the post-natal control group, although the differences were not significant (see Figure 4).

4.1. CONCLUSIONS

Early post-natal NS manipulation by administering finasteride increases the preference to explore new objects in the novelty-seeking test, as well as alcohol consumption in adult age. Moreover, the effect of ondansetron on alcohol consumption is different depending on the post-natal NS manipulation. Only those animals treated with finasteride in the post-natal period, and that showed the highest levels of alcohol intake, exhibit a decrease in EtOH intake in the first days of consumption after receiving the higher dose of ondansetron. This increase in the sensitivity to ondansetron effects reported in post-natal finasteride group suggests possible changes in 5HT₃ receptors function. Taken together, our findings show, for the first time, that the manipulation of NS in crucial stages of development could play an important role in the maturation of the 5HT₃ serotonin receptors, which may be related to drug use/abuse vulnerability.

5. Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (PSI2015-66582-P).

6. References

- [1] B.O. Dubrovsky, Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29(2) (2005) 169-192.
- [2] R.G. Melcangi, G. Panzica, L.M. García-Segura, Neuroactive steroids: focus in human brain, *Neuroscience* 191 (2011) 1-5.

- [3] A.E. Bullock, A.L. Clark, S.R. Grady, S.F. Robinson, B.S. Slobe, M.J. Marks, A.C. Collins, Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes, *J. Neurochem.* 68 (1997) 2412-2423.
- [4] M.D. Majewska, N.L. Harrison, R.D. Schwartz, J.L. Barker, S.M. Paul, Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor, *Science* 232 (1986) 1004-1007.
- [5] C.H. Wetzel, B. Hermann, C. Behl, E. Pestel, G. Rammes, W. Zieglgänsberger, F. Holsboer, R. Rupprecht, Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor, *Mol. Endocrinol.* 12(9) (1998) 1441-1451.
- [6] A.C. Grobin, S. Gizerian, J.A. Lieberman, A.L. Morrow, Perinatal allopregnanolone influences prefrontal cortex structure, connectivity and behavior in adult rats, *Neuroscience* 138(3) (2006) 809-819.
- [7] K. Muneoka, M. Iwata, Y. Shirayama, Altered levels of synapsin I, DA transporter, dynorphin A, and neuropeptide Y in the nucleus accumbens and striatum at post-puberty in rats treated neonatally with pregnenolone or DHEA, *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(6) (2009) 575-581.
- [8] Y. Mukai, T. Higashin, Y. Nagura, K. Shimada, Studies on neurosteroids XXV. Influence of a 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism, *Biol. Pharm. Bull.* 31(9) (2008) 1646-1650.
- [9] L. Modol, C. Casas, X. Navarro, A. Llidó, M. Vallée, M. Pallarès, S. Darbra, Neonatal finasteride administration alters hippocampal $\alpha 4$ and δ GABAAR subunits expression and behavioural responses to progesterone in adult rats, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17(2) (2014) 259-273.
- [10] S. Darbra, L. Modol, A. Llidó, C. Casas, M. Vallée, M. Pallarès, Neonatal allopregnanolone levels alteration: effects on behavior and role of the hippocampus, *Prog. Neurobiol.* 13 (2014) 95-105.
- [11] S. Darbra, M. Pallarès, Neonatal allopregnanolone increases novelty-directed locomotion and disrupts behavioural responses to GABA(A) receptor modulators in adulthood, *Int. J. Dev. Neurosci.* 27(6) (2009) 617-625.
- [12] S. Darbra, M. Pallarès, Effects of early postnatal allopregnanolone administration on elevated plus maze anxiety scores in adult male Wistar rats, *Neuropsychobiology* 65(1) (2012) 20-27.
- [13] B. Zimmerberg, E.W. Kajunski, Sexually dimorphic effects of postnatal allopregnanolone on the development of anxiety behavior after early deprivation, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78(3) (2004) 465-471.
- [14] S.S. Gizerian, S.S. Moy, J.A. Lieberman, A.C. Grobin, Neonatal neurosteroid administration results in development-specific alterations in prepulse inhibition and locomotor activity: Neurosteroids alter prepulse inhibition and locomotor activity, *Psychopharmacology* 86 (2006) 334-342.
- [15] J.W. Dalley, T.D. Fryer, L. Brichard, E.S. Robinson, D.E. Theobald, K. Lääne, Y. Peña, E.R. Murphy, Y. Shah, K. Probst, I. Abakumova, F.I. Aigbirhio, H.K. Richards, Y. Hong, J.C. Baron, B.J. Everitt, T.W. Robbins, Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement, *Science* 315(5816) (2007) 1267-1270.
- [16] V. Deroche-Gamonet, P.V. Piazza, Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control, *Neuropharmacology* 76 (2014) 437-444.
- [17] L. Manzo, M.J. Gómez, J.E. Callejas-Aguilera, R. Donaire, M. Sabariego, A. Fernández-Teruel, A. Cañete, G. Blázquez, M.R. Papini, C. Torres, Relationship between EtOH preference and sensation/novelty seeking, *Physiol. Behav.* 133 (2014) 53-60.

- [18] A. Llidó, I. Bartolomé, S. Darbra, M. Pallarès, Effects of neonatal allopregnanolone manipulations and early maternal separation on adult alcohol intake and monoamine levels in ventral striatum of male rats, *Horm. Behav.* 82 (2016) 11-20.
- [19] A. Llidó, I. Bartolomé, S. Darbra, M. Pallarès, Neonatal finasteride administration decreases DA release in nucleus accumbens after alcohol and food presentation in adult male rats, *Behav. Brain Res.* 309 (2016) 44-50.
- [20] C. Brabant, D.J. Guarnieri, E. Quertemont, Stimulant and motivational effects of alcohol: lessons from rodent and primate models, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122 (2014) 37-52.
- [21] I. Bartolomé, A. Llidó, S. Darbra, M. Pallarès, Effects of neonatal and adolescent neuroactive steroid manipulation on locomotor activity induced by ethanol in male wistar rats, *Behav. Brain Res.* 330 (2017) 68-74.
- [22] M.L. Barbaccia, D. Affricano, M. Trabucchi, R.H. Purdy, G. Colombo, R. Agabio, G.L. Gessa, Ethanol markedly increases 'GABAergic' neurosteroids in alcohol-preferring rats, *Eur. J. Pharmacol.* 384(2-3) (1999) R1-2.
- [23] A.L. Morrow, M.J. VanDoren, S.N. Penland, D.B. Matthews, The role of GABAergic neuroactive steroids in EtOH action, tolerance and dependence, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 37 (2001) 98-109.
- [24] J.M. Torres, E. Ortega, Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans, *Psychopharmacology* 172(3) (2004) 352-355.
- [25] M.J. VanDoren, D.B. Matthews, G.C. Janis, A.C. Grobin, L.L. Devaud, A.L. Morrow, Neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of EtOH, *J. Neurosci.* 20 (2000) 1982-1989.
- [26] D.A. Finn, E.H. Beckley, K.R. Kaufman, M.M. Ford, Manipulation of GABAergic steroids: Sex differences in the effects on alcohol drinking –and withdrawal- related behaviors, *Horm. Behav.* 57(1) (2010) 12-22.
- [27] P. Porcu, A.L. Morrow, Divergent neuroactive steroid responses to stress and ethanol in rat and mouse strains: relevance for human studies, *Psychopharmacology* 231(17) (2014) 3257-3272.
- [28] K. Hirani, A.N. Sharma, N.S. Jain, R.R. Ugale, C.T. Chopde, Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats, *Psychopharmacology* 180(2) (2005) 267-278.
- [29] G.C. Janis, L.L. Devaud, H. Mitsuyama, A.L. Morrow, Effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on the neuroactive steroid 3alphahydroxy- 5alpha-pregnan-20-one in male and female rats, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22 (1998) 2055-2061.
- [30] P.H. Janak, J.E. Redfern, H.H. Samson, The effects of ethanol are altered by the endogenous neurosteroid, allopregnanolone, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 22(5) (1998) 1106-1112.
- [31] E. Martín-García, S. Darbra, M. Pallarès, Intrahipocampal allopregnanolone decreases voluntary chronic alcohol consumption in non-selected rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31(4) (2007) 823-831.
- [32] M.M. Ford, J.D. Nickel, T.J. Phillips, D.A. Finn, Neurosteroid modulators of GABA(A) receptors differentially modulate EtOH intake patterns in male C57BL/6J mice, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 29(9) (2005) 1630-1640.
- [33] M.M. Ford, G.P. Mark, J.D. Nickel, T.J. Phillips, D.A. Finn, Allopregnanolone influences the consummatory processes that govern EtOH drinking in C57BL/6J mice, *Behav. Brain Res.* 179(2) (2007) 265-272.

- [34] E. Martín-García, M. Pallares, Effects of intrahippocampal nicotine and neurosteroid administration on withdrawal in voluntary and chronic alcohol-drinking rats, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29(9) (2005) 1654-1663.
- [35] K.R. Gilliland-Kaufman, M.A. Tanchuck, M.M. Ford, J.C. Crabbe, A.S. Beadles-Bohling, C. Snelling, G.P. Mark, D.A. Finn, The neurosteroid environment in the hippocampus exerts bi-directional effects on seizure susceptibility in mice, *Brain Res.* 1243 (2008) 113-123.
- [36] D.M. Lovinger, 5HT₃ receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic, *Neurochem. Int.* 35 (1999) 125-130.
- [37] A.D. Campbell, R.R. Kohl, W.J. McBride, Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated somatodendritic dopamine release, *Alcohol* 13 (1996) 569-574.
- [38] A.D. Campbell, W.J. McBride, Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51 (1995) 835-842.
- [39] Y. Minabe, C.R.Jr. Ashby, J.E. Schwartz, R.Y. Wang, The 5-HT₃ receptor antagonists LY 277359 and granisetron potentiate the suppressant action of apomorphine on the basal firing rate of ventral tegmental dopamine cells, *Eur. J. Pharmacol.* 209 (1991) 143-150.
- [40] K. Rasmussen, M.E. Stockton, J.F. Czachura, The 5-HT₃ receptor antagonist zatosepron decreases the number of spontaneously active A10 dopamine neurons, *Eur. J. Pharmacol.* 205 (1991) 113-116.
- [41] J.M. Barker, H. Zhang, J.J. Villafane, T.L. Wang, M.M. Torregrossa, J.R. Taylor, Epigenetic and pharmacological regulation of 5HT₃ receptors controls compulsive ethanol seeking in mice, *Eur. J. Neurosci.* 39(6) (2014) 999-1008.
- [42] N. Yaakob, D.T. Malone, B. Exintaris, H.R. Irving, Heterogeneity amongst 5HT₃ receptor subunits: is this significant?, *Curr. Mol. Med.* 1 (2011) 57-68.
- [43] F. Fadda, B. Garau, F. Marchei, G. Colombo, G.L. Gessa, MDL 72222, a selective 5-HT₃ receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rat, *Alcohol* 26 (1991) 107-110.
- [44] M. Heilig, M. Egli, Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms, *Pharmacol. Ther.* 111(3) (2006) 855-876.
- [45] R. McKinzie, R. Cox, R.B. Stewart, W. Dyr, J.M. Murphy, W.J. McBride, L. Lumeng, T.K. Li, Serotonin₃ receptor antagonism of alcohol intake: Effects of drinking conditions, *Alcohol* 15(4) (1998) 291-298.
- [46] Y. Sari, V.R. Johnson, J.M. Weedman, Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 98 (2011) 401-443.
- [47] M. Engel, M.P. Smidt, J.A. van Hooft, The serotonin 5HT₃ receptor: a novel neurodevelopmental target, *Front. Cell. Neurosci.* 7 (2013) 76.
- [48] L. Modol, S. Darbra, M. Vallée, M. Pallarès, Alteration of neonatal allopregnanolone levels affects exploration, anxiety, aversive learning and adult behavioural response to intrahippocampal neurosteroids, *Behav. Brain. Res.* 241 (2013) 96-104.
- [49] S. Darbra, L. Modol, M. Vallée, M. Pallarès, Neonatal neurosteroid levels are determinant in shaping adult prepulse inhibition response to hippocampal allopregnanolone in rats, *Psychoneuroendocrinology* 8(8) (2013) 1397-1406.

- [50] D. Belin, N. Berson, E. Balado, P.V. Piazza, V. Deroche-Gamonet, High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration, *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 569-579.
- [51] S.B. Flagel, M. Waselus, S.M. Clinton, S.J. Watson, H. Akil, Antecedents and consequences of drug abuse in rats selectively bred for high and low response to novelty, *Neuropharmacology* 76 Pt B (2014) 425-436.
- [52] J.A. Foulds, J.M. Boden, G.M. Newton-Howes, R.T. Mulder, L.J. Horwood, The role of novelty seeking as a predictor of substance use disorder outcomes in early adulthood, *Addiction* 112(9) (2017) 1629-1637.
- [53] D. Belin, A. Belin-Rauscent, B.J. Everitt, J.W. Dalley, In search of predictive endophenotypes in addiction: insights from preclinical research, *Genes Brain Behav.* 15(1) (2016) 74-88.
- [54] I. delaPeña, E.L. Gonzales, J.B. delaPeña, B-N. Kimc, D.H. Hand, C.Y. Shinb, J.H. Cheonga, Individual differences in novelty-seeking behavior in spontaneously hypertensive rats: Enhanced sensitivity to the reinforcing effect of methylphenidate in the high novelty-preferring subpopulation, *J. Neurosci. Meth.* 252 (2015) 48-54.
- [55] S. Montagud-Romero, M. Daza-Losada, A. Vidal-Infer, C. Maldonado, M.A. Aguilar, J. Miñarro, M. Rodríguez-Arias, The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of intermittent ethanol administration during adolescence, *PLoS One* 9(3) (2014) e92576.
- [56] J.R. Parkitna, M. Sikora, S. Golda, K. Golembiowska, B. Bystrowska, D. Engblom, A. Bilbao, R. Przewlocki, Novelty-seeking behaviors and the escalation of alcohol drinking after abstinence in mice are controlled by metabotropic glutamate receptor 5 on neurons expressing Dopamine D1 receptors, *Biol. Psychiatry* 73(3) (2013) 263-270.
- [57] D.L.M. Cyrenne, G.R. Brown, Effects of suppressing gonadal hormones on response to novel objects in adolescent rats, *Horm. Behav.* 60 (2011) 625-631.
- [58] A. Ennaceur, One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues, *Behav. Brain Res.* 215 (2010) 244-254.
- [59] J. Besheer, K.R. Short, R.A. Bevins, Dopaminergic and cholinergic antagonism in a novel-object detection task with rats, *Behav. Brain Res.* 126(1-2) (2001) 211-217.
- [60] V. Vargas-López, A. Torres-Berrio, L. González-Martínez, A. Múnera, M.R. Lamprea, Acute restraint stress and corticosterone transiently disrupts novelty preference in an object recognition task, *Behav. Brain Res.* 291 (2015) 60-66.
- [61] A.C. Molander, A. Mar, A. Norbury, S. Steventon, M. Moreno, D. Caprioli, D.E.H. Theobald, D. Belin, B. Everitt, T.W. Robbins, J.W. Dalley, High impulsivity predicting vulnerability to cocaine addiction in rats: some relationship with novelty preference but not novel reactivity, anxiety or stress, *Psychopharmacology* 215 (2011) 721-731.
- [62] D.M. Tomkins, A.D. Le, E.M. Sellers, Effect of the 5-HT3 antagonist ondansetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure, *Psychopharmacology* 117(4) (1995) 479-485.
- [63] P. De Deurwaerdère, D. Moison, S. Navailles, G. Porras, U. Spampinato, Regionally and functionally distinct serotonin3 receptors control in vivo DA outflow in the rat nucleus accumbens, *J. Neurochem.* 94(1) (2005) 140-149.
- [64] S Fuentes, N. Daviu, H. Gagliano, P. Garrido, D. Zelena, N. Monasterio, A. Armario, R. Nadal, Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience?, *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 56.

- [65] A. Vidal-Infer, M.C. Arenas, M. Daza-Losada, M.A. Aguilar, J. Miñarro, M. Rodríguez-Arias, High novelty-seeking predicts greater sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 102(1) (2012) 124-132.
- [66] S. Darbra, M. Pallarès, Alterations in neonatal neurosteroids affect exploration during adolescence and prepulse inhibition in adulthood, *Psychoneuroendocrinology* 35(4) (2010) 525-535.
- [67] A.H. Söderpalm, S. Hansen, Alcohol alliesthesia: food restriction increases the palatability of alcohol through a corticosterone-dependent manner, *Physiol. Behav.* 67(3) (1999) 409-415.
- [68] K.D. Carr, Food scarcity, neuroadaptations, and the pathogenic potential of dieting in an unnatural ecology: binge eating and drug abuse, *Physiol. Behav.* 104(1) (2011) 162-167.
- [69] D.J. Knapp, L.A. Pohorecky, Zacopride, a 5-HT₃ receptor antagonist, reduces voluntary ethanol consumption in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41(4) (1992) 847-850.
- [70] C.F. Moore, M.D. Lycas, C.W. Bond, B.A. Johnson, W.J. Lynch, Acute and chronic administration of a low-dose combination of topiramate and ondansetron reduces ethanol's reinforcing effects in male alcohol preferring (P) rats, *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 22(1) (2014) 35-42.
- [71] Q. Pei, T. Zetterström, R.A. Leslie, D.G. Grahame-Smith, 5-HT₃ receptor antagonists inhibit morphine-induced stimulation of mesolimbic dopamine release and function in the rat, *Eur. J. Pharmacol.* 230(1) (1993) 63-8.
- [72] Z.A. Rodd, R.I. Melendez, R.L. Bell, K.A. Kuc, Y. Zhang, J.M. Murphy, W.J. McBride, Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons, *J. Neurosci.* 24(5) (2004) 1050-1057.
- [73] A.D. Lê, D. Funk, S. Harding, W. Juzytsch, P.J. Fletcher, Y. Shaham, Effects of dexfenfluramine and 5-HT₃ receptor antagonists on stress-induced reinstatement of alcohol seeking in rats, *Psychopharmacology* 186(1) (2006) 82-92.
- [74] P.M. Beardsley, O.T. Lopez, G. Gullikson, D. Flynn, Serotonin 5-HT₃ antagonists fail to affect ethanol self-administration of rats, *Alcohol* 11(5) (1994) 389-395.
- [75] M.M. Yardley, L.A. Ray, Medications development for the treatment of alcohol use disorder: insights into the predictive value of animal and human laboratory models, *Addict. Biol.* 22(3) (2017) 581-615.

		VEHICLE	FINASTERIDE	ALLOP
Contacts	Old	9.68 ± 0.80	6.94 ± 0.68***	10.34 ± 0.90
	New	8.63 ± 0.79	7.76 ± 0.61	10.38 ± 1.01
Exploration Time	Old	33.97 ± 3.14	22.04 ± 2.47	37.03 ± 5.35
	New	30.46 ± 3.01	27.36 ± 3.14	36.06 ± 4.30
Area Entries	Old	17.74 ± 1.89	11.74 ± 1.45*#	17.03 ± 1.77
	New	15.13 ± 1.68	13.97 ± 1.49	17.91 ± 1.86
Area Time	Old	25.03 ± 2.60	17.61 ± 2.04***	37.86 ± 5.55 ⁺⁺
	New	26.80 ± 3.16	24.63 ± 4.13	37.64 ± 5.11

Table 1. Raw data from novel object recognition results in test trial expressed in X±SEM.

Significant PNAT effect in time spent exploring the old object [F(2,103)=4.21 p<0.05], time in the old object area [F(2,103)=7.91 p<0.001], old object contacts [F(2,103)=5.01 p<0.01] and entries in the old object area [F(2,103)=3.62 p<0.05]. Differences in novel object contacts [F(2,103)=2.54 p=0.08] and time spent in novel object area [F(2,103)=2.72 p=0.07] just failed to reach statistical significance. Symbols indicate the following differences: # finasteride vs. VEH; * finasteride vs. AlloP; + VEH vs. AlloP. (One symbol: p<0.05; two symbols: p<0.01 and three symbols: p<0.001).

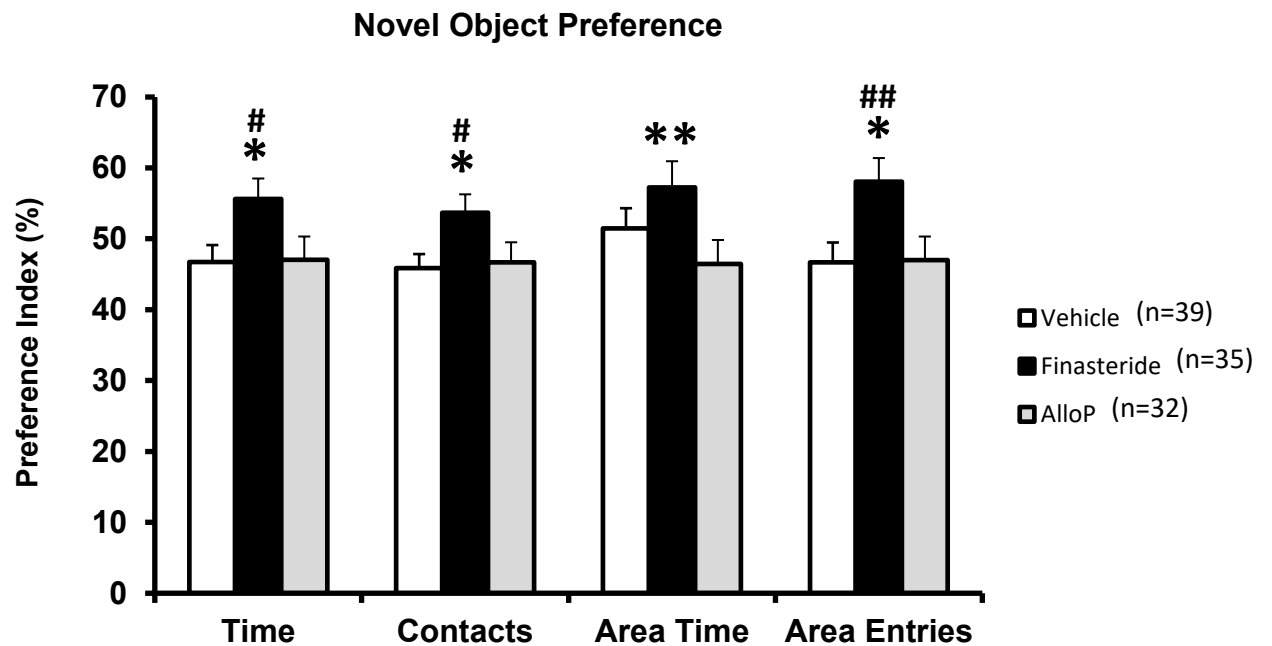


Figure 1. Early post-natal finasteride administration induces preference for new object in novel object recognition test. Significant PNAT effect in the novel object exploration preference, in time [$F(2,103)=3.20$; $p<0.05$], contacts [$F(2,103)=3.14$; $p<0.05$], time spent in the area [$F(2,103)=4.13$; $p<0.05$] and area entries [$F(2,103)=5.56$; $p<0.01$]. Symbols indicate the following differences: # finasteride vs. VEH; * finasteride vs. AlloP. One symbol: $p<0.05$; two symbols: $p<0.01$. Number of subjects is detailed in the figure.

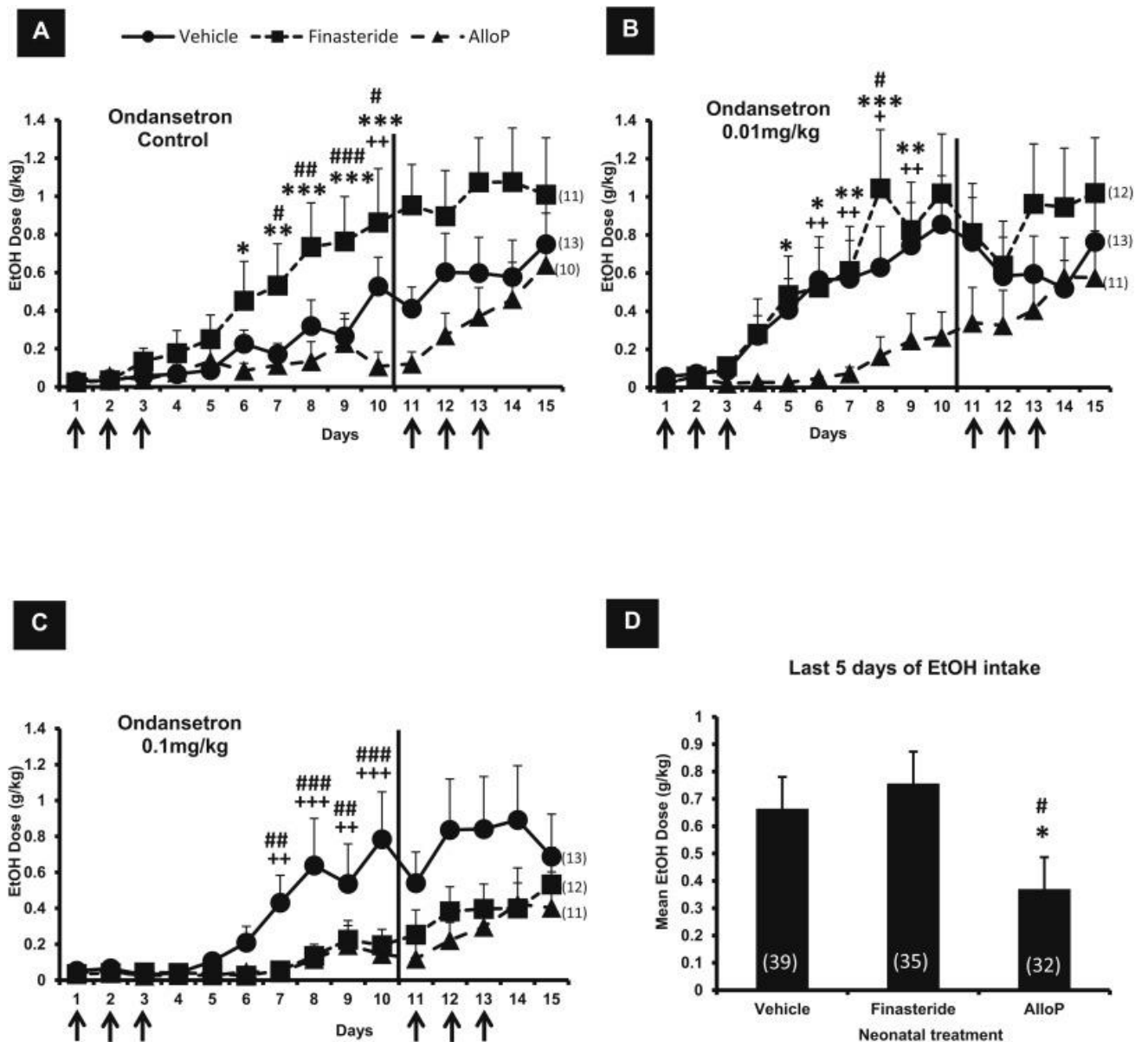


Figure 2. Early post-natal NS manipulation and adult ondansetron treatment on EtOH consumption. **A)** Control ondansetron group: Finasteride group shows higher levels of EtOH consumption (PNAT x TIME [F(18,279)=2.43; $p < 0.001$]). **B)** Low ondansetron dose: AlloP group consume lower levels of alcohol compared to other groups (PNAT x TIME [F(18,279)=1.89, $p < 0.05$]) **C)** High ondansetron dose: 0.1 mg/kg decreased alcohol consumption only in the animals post-natally treated with finasteride (PNAT x TIME [F(18,279)=2.66; $p < 0.001$]). **D)** Animals post-natally treated with AlloP show lower levels of consumption in the last 5 days (in average) compared to other groups (PNAT [F(2,97)=2.78; $p = 0.06$], data collapsed across ondansetron treatment). Symbols indicate the following differences: # finasteride vs. VEH; * finasteride vs. AlloP; + VEH vs. AlloP. (One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$ and three symbols: $p < 0.001$). The arrows indicate the days of injections, and number of subjects is detailed in the figure.

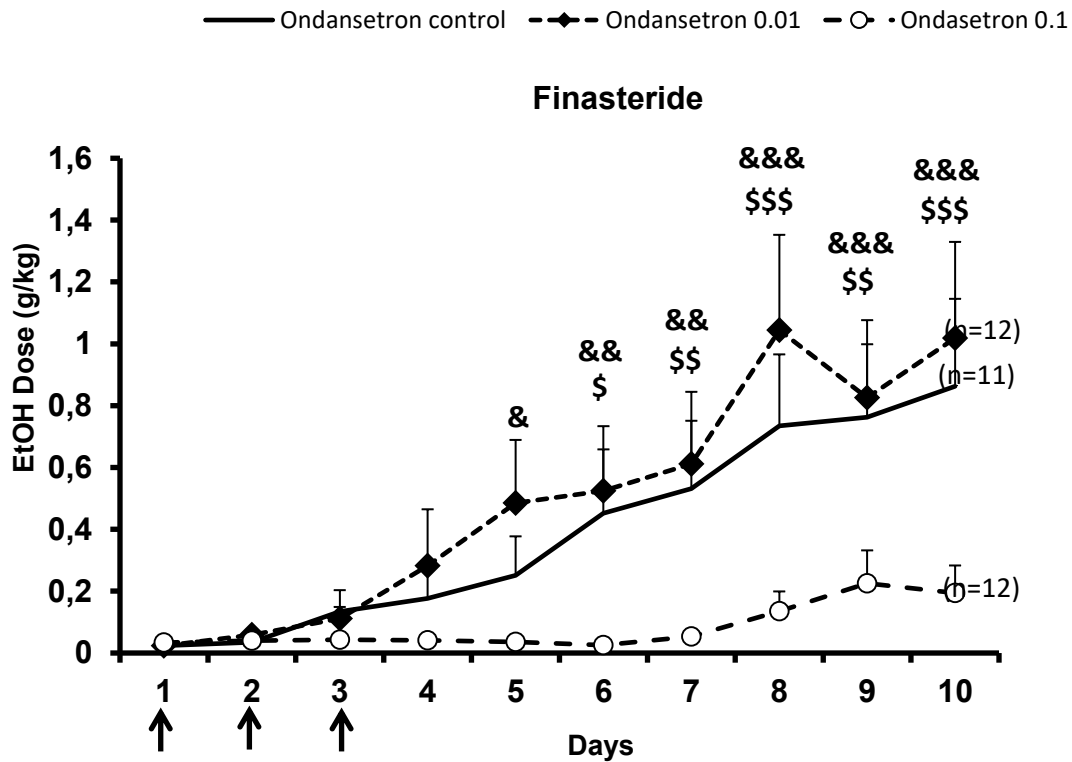


Figure 3. High ondansetron dose decreased alcohol consumption in those animals post-natally treated with finasteride. Significant interaction OND x TIME [F(18,288)=2.42, $p < 0.01$]. Symbols indicate the following differences: \$ Ondansetron control vs. Ondansetron 0.1; & Ondansetron 0.01 vs. Ondansetron 0.1. (One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$ and three symbols: $p < 0.001$). The arrows indicate the days of injections, and number of subjects is detailed in the figure.

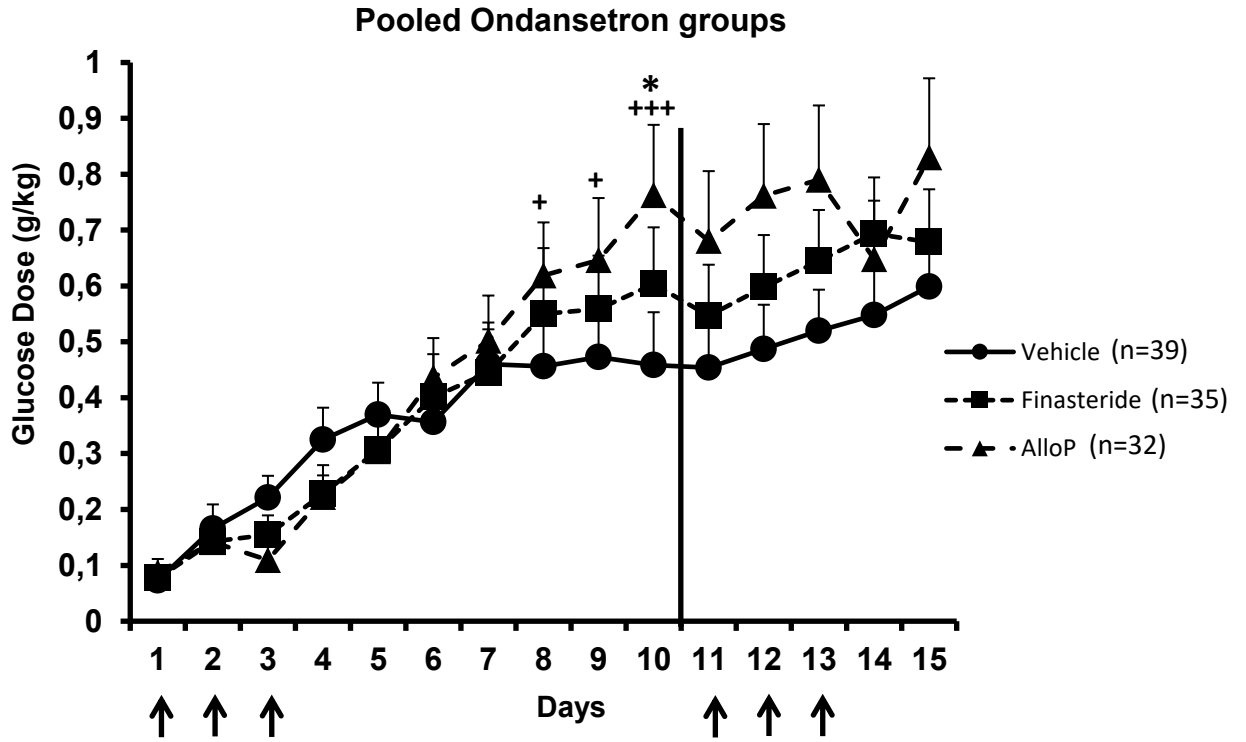


Figure 4. Post-natal AlloP increases glucose consumption. AlloP group presented higher levels of glucose consumption regardless of ondansetron treatment (PNAT x TIME [F(18,873)=2.17; p<0.01]). Symbols indicate the following differences: * finasteride vs. AlloP; + VEH vs. AlloP. (One symbol: p<0.05; two symbols: p<0.01 and three symbols: p<0.001). The arrows indicate the days of injections, and number of subjects is detailed in the figure.

EXPERIMENTO 2b. Resultados

Efectos de la manipulación postnatal temprana de los niveles de esteroides neuroactivos sobre la expresión del receptor de la serotonina tipo 3 en el mesencéfalo

1. Expresión del receptor 5-HT3 durante la etapa postnatal temprana

Para analizar la densidad del receptor 5-HT3 en las muestras del mesencéfalo neonatal, se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) con dos factores entre-grupo, el factor tratamiento NEO (3 niveles: VEH, ALLO y FIN) y el factor de extracción DIA (4 niveles: PN6, PN9, PN12, PN15).

El análisis mostró un efecto significativo del factor DIA [$F(3,56)=5.12$; $p<0.01$]. No se observaron diferencias en función de NEO [$F(2,56)=0.33$; N.S.] ni de la interacción DIA x NEO [$F(6,56)=0.78$; N.S.].

Adicionalmente se analizó cada una de las curvas de expresión del receptor (para cada tratamiento neonatal) mediante comparaciones de medias. Se observó un aumento estadísticamente significativo de la expresión 5-HT3 entre los días PN6 y PN12 en el grupo control (NEO VEH) ($t=-2.73$; $p<0.05$). En cambio, este aumento en la densidad del receptor del grupo ALLO se observó entre PN6 y PN9 ($t=-2.3$; $p<0.05$). En el grupo FIN no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes días de extracción de las muestras. Estos resultados indican que la máxima expresión del receptor 5-HT3 mesencefálico se dio en PN12 en los animales tratados neonatalmente con

vehículo, mientras que en los sujetos tratados con allopregnanolona se adelantó a PN9 (ver figura 6).

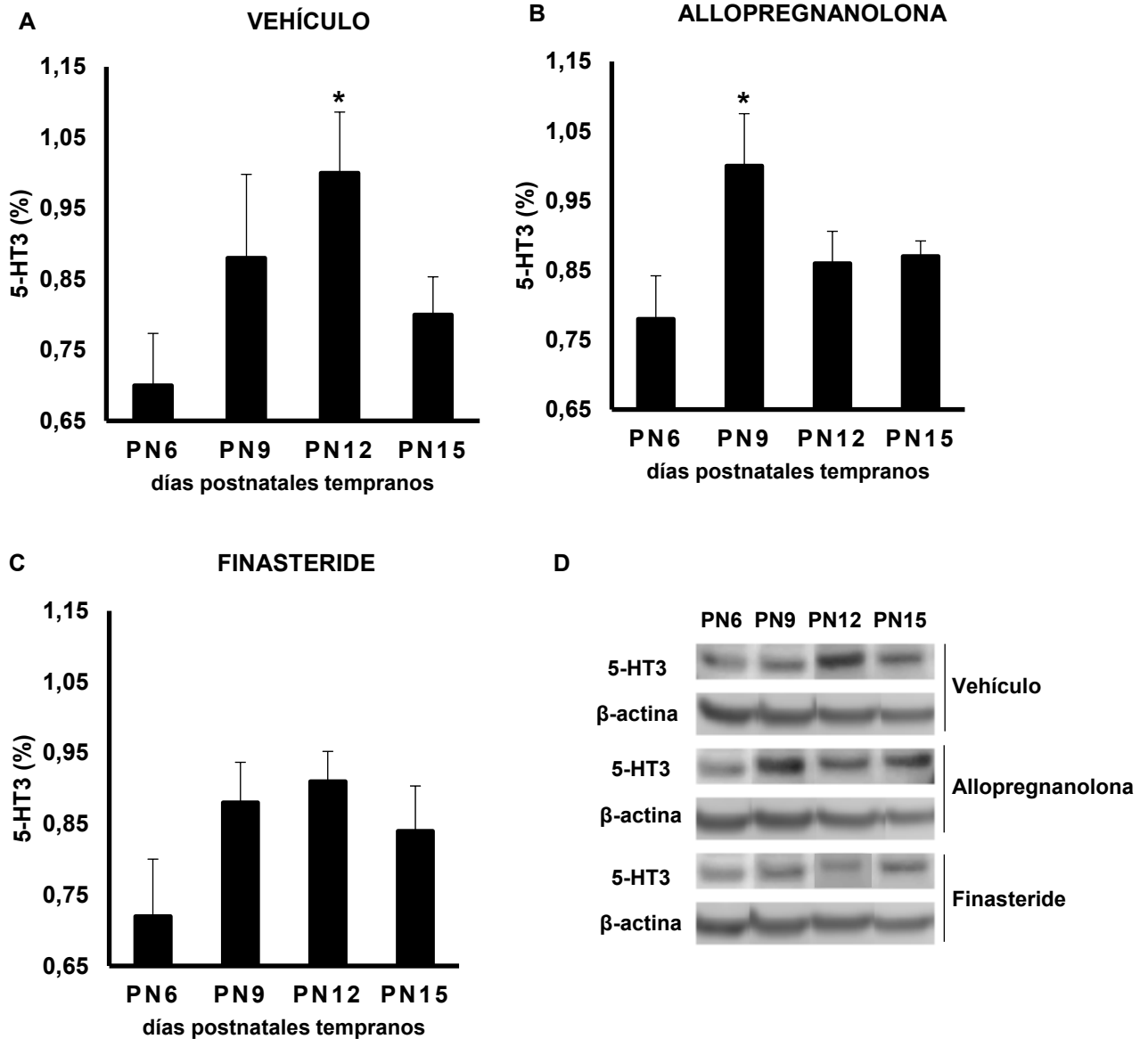


Figura 6. Porcentaje de expresión de la proteína del receptor 5-HT3. **A)** La expresión del receptor 5-HT3 es diferente en el grupo vehículo entre PN6 y PN12 ($t=-2.73$; $p<0.05$). **B)** La expresión del receptor 5-HT3 es diferente en el grupo allopregnanolona entre los días PN6 y PN9 ($t=-2.3$; $p<0.05$). **C)** No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo finasteride entre los diferentes días de extracción de las muestras. **D)** Imagen de las bandas del Western Blot. (Un símbolo: $p < 0.05$).

2. Expresión del receptor 5-HT3 en edad adulta

Respecto a la expresión del receptor 5-HT3 en estriado ventral adulto, en primer lugar, se analizó si el tratamiento con ondansetron durante la edad adulta produjo efectos en la expresión del receptor 5-HT3. Para ello se seleccionaron animales controles (vehículo neonatal) y se aplicó un análisis de la varianza usando el tratamiento con ondansetron ONDAN (3 niveles: salino, ondansetron dosis baja (0.01mg/kg) y ondansetron dosis alta (0.1mg/kg)) como variable independiente.

Aunque la expresión del receptor 5-HT3 fue menor en el grupo tratado con la dosis alta de ondansetron (0.93 ± 0.079) que en los grupos salino (1.12 ± 0.096) o ondansetron a dosis bajas (1.1 ± 0.098), el análisis de no mostró diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento con ondansetron [$F(2,17)=1.4$; N.S.].

Por otro lado, para estudiar los efectos del tratamiento neonatal y su posible interacción con la administración de ondansetron en edad adulta, empleamos un análisis de la varianza con dos factores entre-grupo. El primer factor fue el grupo neonatal (NEO: VEH, ALLO y FIN) y el segundo el tratamiento adulto (ONDAN: salino, ondansetron dosis baja y ondansetron dosis alta). El análisis mostró que no había diferencias estadísticamente significativas en la expresión del receptor 5-HT3 en función del tratamiento neonatal [$F(2,55)=0.18$; N.S.] o del tratamiento adulto [$F(2,55)=1.35$; N.S.] ni en su interacción [$F(4,55)=0.2$; N.S.].

RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo muestran que la alteración de los niveles fisiológicos de NAS en etapas cruciales del desarrollo puede desempeñar un papel importante en la vulnerabilidad al consumo inicial de EtOH.

En el primer experimento, se estudió el efecto de la manipulación neonatal y adolescente de los niveles de NAS sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH en edad adulta. Al comparar diferentes dosis de EtOH (0.5g/kg, 0.8g/kg y vehículo) en ratas Wistar macho NH (PN70), los resultados mostraron que la administración de 0.5g/kg de EtOH provocaba un efecto estimulante significativo sobre la actividad locomotora en la prueba de OF. Por lo tanto, se utilizó esta dosis para evaluar el efecto de la manipulación neonatal de los niveles de NAS sobre la sensibilidad a una dosis estimulante de EtOH. Los resultados indicaron que la administración neonatal de finasteride (PN5-PN9) reduce la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices de 0.5g/kg de EtOH en comparación con el resto de los grupos (allopregnanolona, vehículo y NH). Además, esta diferencia no se observó en aquellas ratas que habían sido tratadas con PROG, principal precursor de la allopregnanolona, durante la adolescencia temprana (PN30). Por otra parte, se constató que la administración de PROG aumentaba el porcentaje de entradas y tiempo en brazos abiertos en la prueba de EPM durante la adolescencia temprana, independientemente del tratamiento recibido neonatalmente y sin provocar diferencias en la actividad global. Por lo tanto, la administración de PROG durante la adolescencia temprana indujo un perfil de tipo ansiolítico. El principal hallazgo muestra que la alteración de los niveles fisiológicos de NAS neonatales mediante la inhibición

de la enzima 5 α -reductasa (tratamiento con finasteride) disminuye la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices de una dosis baja de EtOH, y este efecto puede modificarse mediante la administración de PROG en la adolescencia temprana.

En el segundo experimento, se evaluó si la manipulación neonatal de los niveles de NAS modulaba la preferencia por la novedad y/o el efecto del antagonista del receptor 5-HT₃ ondansetron sobre el consumo voluntario de EtOH, además de provocar una alteración en la expresión de este receptor serotoninérgico.

En la primera fase de este experimento (experimento 2a), los resultados indicaron que los animales tratados neonatalmente con finasteride (PN5-PN9) exhibían un aumento del índice de preferencia por la novedad (preferencia por el objeto nuevo = (objeto nuevo / (objeto nuevo + objeto viejo)) x 100) comparado con el resto de los grupos (allopregnanolona, vehículo). Además, estos animales presentaban un mayor consumo inicial de EtOH. En cambio, la administración neonatal de allopregnanolona redujo la preferencia por esta droga. Por otro lado, este experimento puso de manifiesto que la administración de ondansetron (0.1mg/kg) durante los primeros días de consumo disminuía la ingesta inicial de EtOH sólo en el grupo tratado neonatalmente con finasteride. Por lo tanto, la alteración de los niveles fisiológicos de NAS durante etapas cruciales del neurodesarrollo altera el efecto de un antagonista del receptor 5-HT₃ sobre el consumo inicial de EtOH.

En la segunda fase de este experimento (experimento 2b) se investigó si la manipulación de los niveles de NAS neonatales había alterado la expresión del receptor 5-HT₃. Los resultados obtenidos en la etapa postnatal temprana

mostraron el valor máximo de expresión del receptor 5-HT₃ mesencefálico en PN12 en aquellos animales tratados neonatalmente con vehículo. En cambio, los sujetos administrados con allopregnanolona durante el periodo postnatal temprano exhibieron un aumento en la expresión del receptor 5HT₃ similar al grupo control, aunque produciéndose días antes (PN9). Por otro lado, los animales tratados neonatalmente con finasteride no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del receptor 5-HT₃ entre los días de extracción de las muestras. En los resultados obtenidos en edad adulta (estriado ventral), no se obtuvieron diferencias en la expresión del receptor 5-HT₃ provocadas por el tratamiento con ondansetron y el consumo de EtOH, ni en función del tratamiento neonatal.

En el apartado siguiente se puede encontrar una discusión detallada de los resultados de cada experimento además de una discusión general sobre el conjunto de datos obtenidos en esta tesis doctoral.

DISCUSIÓN

Ateración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal y adolescencia tempranas: Efectos sobre la conducta emocional

Los resultados del primer experimento sobre la conducta adolescente mostraron que la administración de PROG (PN30-PN32) aumentó tanto el porcentaje de entradas como el tiempo transcurrido en los brazos abiertos del EPM sin alterar la actividad global e independientemente del tratamiento neonatal. Pisu y colaboradores (2016) han observado que la administración de PROG (5mg/kg, una vez al día durante 5 días) aumenta los niveles de allopregnanolona tanto corticales como plasmáticos en ratas macho. Además, el perfil ansiolítico de la PROG en respuestas adaptativas al estrés y la ansiedad parece estar mediado por su metabolito, allopregnanolona, implicando la regulación de la actividad de los receptores GABAA (Melcangi et al. 2014; Schumacher et al., 2014) en ambos sexos (Gulinello et al., 2002; Schumacher et al., 2014). Por lo tanto, aunque en nuestro experimento no se midieron los niveles de allopregnanolona y la dosis de PROG utilizada fue mayor (25mg/kg, una vez al día durante 3 días), es plausible que el efecto ansiolítico en la prueba de EPM observado en los animales administrados con PROG estuviera relacionado con su conversión en allopregnanolona. Sin embargo, no se pueden descartar otros efectos producidos por la alta dosis que ha sido utilizada en nuestro estudio (como podría ser un aumento de otros de los metabolitos de la PROG como la THDOC o la testosterona, o su acción en otros receptores como el 5-HT3 o el receptor de la progesterona).

Por otro lado, no se observaron efectos de la manipulación neonatal de los niveles de NAS en la prueba de EPM, ni en su modulación de la respuesta conductual a la administración de PROG. Esta ausencia de efectos no era esperada, ya que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio habíamos comprobado que la manipulación de los niveles de NAS neonatales alteraba la conducta exploratoria en la adolescencia (Darbra y Pallarés, 2010), así como el comportamiento de tipo ansioso en edad adulta (Darbra y Pallarés, 2012). Estas diferencias entre los datos del presente trabajo y resultados previos podrían ser debidas a las distintas metodológicas utilizadas en cada experimento, tales como la dosis neonatal de allopregnanolona administrada (20mg/kg vs. 10mg/kg), el tipo de conducta emocional (ansiedad vs. exploración de ambientes nuevos) o la etapa del desarrollo en que se efectúa la evaluación del comportamiento (PN30 vs. PN40/PN60 o PN80). En este sentido, en nuestro laboratorio ya habíamos observado un efecto de la edad en la evaluación conductual, independientemente del tratamiento neonatal. Concretamente, los niveles de exploración de agujeros en la prueba de Boissier fueron más altos en PN40 que en PN60 (Darbra y Pallarés, 2010). Estos resultados ponen de manifiesto que los efectos conductuales concretos observados durante un periodo del desarrollo no tienen por qué manifestarse en otras etapas (Doremus-Fitzwater et al., 2012; Barbayannis et al., 2017; Blume et al., 2018).

Alteración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal y adolescencia tempranas: Sensibilidad a los efectos estimulantes de una dosis baja de EtOH

Los datos obtenidos en el estudio preliminar (experimento 1) mostraron que la administración de una dosis de 0.5g/kg de EtOH produce un efecto estimulante sobre la conducta locomotriz en la prueba de OF en ratas Wistar macho. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en un estudio realizado en la misma cepa (Karlsson y Roman, 2016) y corroboran datos previos reportados en ratas Long-Evans (Blakley y Pohorecky, 2006). Así, esta dosis (0.5g/kg) se utilizó para evaluar los efectos de la manipulación neonatal de los niveles de NAS en la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH. Los resultados indicaron que la administración neonatal de finasteride disminuye la actividad locomotora inducida por una dosis baja de EtOH. Estos datos sugieren que la alteración de los niveles neonatales de NAS puede modular la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices producidos por el EtOH, los cuales han sido considerados un factor de riesgo para el consumo y la dependencia alcohólica (Schuckit, 1994; Holdstock et al., 2000; King et al., 2002; King et al., 2011). Además, varios autores han sugerido que tanto la estimulación locomotriz como las propiedades reforzantes/motivacionales del EtOH son producidas por la activación de la vía dopaminérgica que proyecta desde el ATV hacia el núcleo accumbens (Wise y Bozarth, 1987; Phillips y Shen, 1996; Amalric y Koob 1993; Tzschentke y Schmidt 2000; Meyer et al., 2009; Gubner et al., 2013; Söderpalm y Ericson, 2013), así que, sería interesante realizar más experimentos para comprobar si el tratamiento neonatal con finasteride está alterando la estructura

o funcionalidad del sistema dopaminérgico mesolímbico, y afectando no sólo la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices del EtOH, sino también la sensibilidad a la búsqueda de la droga.

Es importante señalar que la disminución en la respuesta locomotora a una dosis estimulante de EtOH provocada por el tratamiento neonatal con finasteride no se observó en aquellos animales administrados con PROG durante la adolescencia temprana. Estos resultados sugieren que algunos de los cambios causados por las distintas manipulaciones neonatales pueden ser modulados por los niveles de NAS en la adolescencia temprana, y ponen de relieve la importancia de este período de adaptación necesario para la especialización de los sistemas cerebrales (Luna et al., 2015; Romeo, 2017).

Finalmente, se observó un efecto de la manipulación postnatal temprana en la conducta locomotriz basal en edad adulta. Los animales tratados neonatalmente con vehículo exhibieron una mayor actividad motriz comparado con el grupo que no fue manipulado, independientemente del tratamiento recibido durante la adolescencia. En este sentido, ha sido puesto de manifiesto que los eventos ambientales durante etapas tempranas del neurodesarrollo pueden inducir cambios en el comportamiento adulto (Stamatakis et al., 2008; Todeschin et al., 2009). Anteriormente ya habíamos observado efectos de la manipulación neonatal en estudios realizados en nuestro laboratorio. Concretamente, observamos que los animales administrados neonatalmente con vehículo mostraban una disminución en la conducta exploratoria en la prueba de Boissier y un aumento en las pautas conductuales relacionadas con la ansiedad en el EPM en comparación con el grupo no manipulado, efecto que fue

neutralizado por la administración neonatal de allopregnanolona (Mòdol et al., 2013).

Ateración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal temprana: Preferencia por la novedad

Los resultados del experimento 2a indicaron que la administración postnatal temprana de finasteride aumentaba el índice de preferencia por explorar un objeto nuevo frente a uno familiar en comparación con el grupo control y el tratado con allopregnanolona, lo que sugiere que los animales administrados con finasteride presentarían un perfil de búsqueda de la novedad. Si bien no hemos evaluado el rasgo de búsqueda de sensaciones, en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en pruebas de exploración de ambientes nuevos, observamos que la administración postnatal temprana de finasteride inducía una disminución de la exploración y de la actividad locomotriz en la prueba de Boissier durante la adolescencia (PN40 y PN60) (Darbra y Pallarés, 2010) y en edad adulta (Mòdol et al., 2013). Estos últimos resultados junto con los del presente trabajo muestran que los animales tratados con finasteride exhiben una menor actividad locomotriz en ambientes nuevos, pero ante la elección de explorar un objeto nuevo vs. uno familiar, prefieren la novedad. Por lo tanto, es posible que estos animales presenten un perfil de búsqueda de novedad, pero no de sensaciones, lo que iría en concordancia con la hipótesis que propone que estos dos rasgos son dissociables (Cain et al., 2005, Belin et al., 2011; Flagel et

al., 2014). De todas formas, para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar pruebas de búsqueda de sensaciones en nuestros animales.

Alteración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal temprana en el consumo inicial de EtOH: Implicación del receptor 5-HT3

En el segundo experimento también se evaluó el efecto de la manipulación de los niveles de NAS durante la etapa postnatal temprana en la acción de un antagonista selectivo del receptor 5-HT3 sobre el consumo inicial de EtOH, además de analizar la alteración en la expresión de este receptor en el mesencéfalo neonatal y el estriado ventral adulto. Como nos interesaba seguir estudiando el efecto del finasteride, el cual, según resultados anteriores, provoca una mayor vulnerabilidad al consumo voluntario (Llidó et al., 2016a; Llidó et al., 2016b), decidimos no administrar PROG durante la adolescencia temprana, ya que ésta neutralizó los efectos del finasteride neonatal sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices de 0.5g/kg de EtOH.

Los resultados de la primera fase de este experimento mostraron que la dosis más alta del antagonista del receptor 5-HT3, ondansetron (0.1mg/kg), sólo disminuyó el consumo de EtOH en los animales que habían sido tratados neonatalmente con finasteride, los cuales presentaban niveles más altos de ingesta de esta droga. El aumento del consumo de EtOH que muestran los sujetos administrados con finasteride corrobora resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en ratas que habían seguido el mismo paradigma de consumo (acceso a la droga y al alimento durante 1h al día) (Llidó et al., 2016a;

Llidó et al., 2016b). En el presente trabajo se utilizó la restricción alimentaria para poder comparar nuestros resultados con los de estos experimentos previos y para aumentar la búsqueda de drogas, además de la magnitud de la recompensa que ésta provoca (Söderpalm y Hansen, 1999; Carr, 2011). Sin embargo, sería interesante comprobar si el tratamiento con finasteride neonatal también provoca un aumento de la ingesta de la droga en modelos de consumo de EtOH donde los animales tienen libre acceso a la comida sin restricciones.

Si bien ha sido documentado que la administración de ondansetron (0.01 y 0.1mg/kg) reduce el consumo de EtOH en ratas Wistar machos (Tomkins et al., 1995) y atenúa la búsqueda de esta droga (Lê et al., 2006), en nuestro experimento no se observaron efectos del ondansetron sobre el consumo del grupo control. Estos datos irían en consonancia con otros estudios que han documentado que estas dosis son ineficaces para reducir el consumo (Pei et al., 1993; Beardsley et al., 1994; para una revisión ver Yardley y Ray, 2017). El efecto del ondansetron sólo fue significativo en aquellos animales tratados neonatalmente con finasteride, poniendo de manifiesto la existencia de diferencias individuales moduladas por la alteración de los niveles de NAS durante el desarrollo temprano. Probablemente se necesitarían dosis más altas de ondansetron para producir una reducción significativa de la ingesta de EtOH en los animales control. De hecho, la efectividad de los antagonistas del receptor 5-HT₃ dependen de la dosis, las condiciones de consumo de EtOH, la duración del tratamiento farmacológico o el sexo y la cepa de los animales (Knapp y Pohorecky, 1992; Pei et al., 1993; McKinzie et al., 1998; Moore et al., 2014).

El receptor 5-HT₃ está relacionado con las propiedades reforzantes del EtOH a través de la modulación de la liberación de dopamina en el núcleo

accumbens (Minabe et al., 1991; Rasmussen et al., 1991; Campbell y McBride, 1995; Campbell et al., 1996; Deehan et al., 2016). En ese sentido, estudios in vitro han puesto de manifiesto que los receptores 5-HT₃ modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el ATV (Campbell et al., 1996), y que una dosis de 0.1mg/kg de ondansetron reduce la liberación de dopamina inducida por la morfina en el núcleo accumbens en ratas (De Deurwaerdère et al., 2005). Por lo tanto, una mayor sensibilidad a los efectos del ondansetron sobre la ingesta de EtOH en los animales tratados neonatalmente con finasteride podría estar indicando una disminución más efectiva de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens comparado con el grupo control. Si fuera así, estos resultados sugerirían que el grupo finasteride podría presentar una alteración del receptor 5-HT₃ provocando un efecto antagonista más potente del fármaco ondansetron. Por otro lado, dado que los sujetos administrados neonatalmente con finasteride liberan menos dopamina en el núcleo accumbens en estadios iniciales del consumo de EtOH comparado con el grupo control (Llidó et al., 2016b), sugiriendo la presentación de un tono hipodopaminérgico, es posible que el tratamiento con ondansetron (0.1mg/kg) esté disminuyendo la liberación de dopamina mesolímbica hasta niveles que no producen refuerzo/motivación por consumir EtOH en el grupo finasteride. En cambio, en el grupo control, que supuestamente presenta niveles previos de dopamina más elevados, esta misma dosis de ondansetron no sería capaz de disminuir la liberación de dopamina hasta un nivel parecido al del grupo tratado con finasteride.

Debe tenerse en cuenta que los efectos del ondansetron sobre la ingesta de EtOH sólo fueron visibles días después de su administración. Las dosis de EtOH consumidas durante los tres primeros días de consumo eran muy bajas,

como era esperable. Cuando se usa un modelo de libre elección para determinar la ingesta voluntaria de EtOH en ratas, los animales generalmente no adquieren una alta ingesta de esta droga, a menos que se usen animales genéticamente predispuestos para un alto consumo (Gustafsson y Nylander, 2006). La mayoría de las ratas no preferidoras generalmente presentan una ingesta baja de soluciones de EtOH (Richter y Campbell, 1940; Hansen et al., 1994; Gustafsson y Nylander, 2006), tal como se observa en nuestros animales, los cuales exhiben un consumo inicial bajo que aumenta progresivamente a lo largo de los días. No obstante, el grupo finasteride tratado con 0.1mg/kg de ondansetron mantuvo los niveles de consumo muy bajos hasta la mitad de la segunda semana. Como ya se ha comentado, las primeras administraciones de ondansetron podrían estar alterando la motivación por la búsqueda de la recompensa inducida por el EtOH en el grupo finasteride mediante la reducción de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens a través de su acción sobre los receptores 5-HT3 (Pei et al., 1993; Rodd et al., 2004; Sari et al., 2011). Este efecto se reflejaría en el consumo posterior, ya que la respuesta subjetiva inicial a los efectos reforzantes/motivacionales del EtOH se ha definido como un endofenotipo en la etiología del alcoholismo que refleja su capacidad para predecir el consumo futuro de EtOH, además de su uso indebido (Ray et al., 2010; King et al., 2011; Nentwig et al., 2017).

Respecto a los resultados de la preferencia por el consumo de EtOH, los animales tratados con allopregnanolona durante el período postnatal temprano presentaban una menor preferencia por el consumo de esta droga comparado con el resto de los grupos, e independientemente del tratamiento con ondansetron. Cabe señalar que no hubo diferencias entre los grupos en la

ingesta total de líquidos, por lo que las diferencias de preferencia entre los sujetos tratados con allopregnanolona y el resto de los grupos no se relacionaron con una disminución general en la ingesta de líquidos. En cambio, los animales tratados con finasteride no exhibieron diferencias en la preferencia de EtOH respecto al grupo vehículo. Estos resultados pueden ser explicados por los niveles de consumo de estos animales, ya que, en general, presentan altos niveles de ingesta de EtOH, además de altos niveles de consumo de glucosa, lo que concuerda con resultados obtenidos en experimentos previos (Lidó et al., 2016a). En este sentido, varios estudios han demostrado que una alta ingesta de soluciones dulces correlaciona positivamente con un alto consumo de EtOH (Gosnell y Krahn, 1992; Koros et al., 1998), así como, se ha observado que diversas líneas de ratas criadas selectivamente para preferir el EtOH también muestran una alta preferencia por soluciones dulces (Dess et al., 1998; Woods et al., 2003), sugiriendo la existencia de un solapamiento genético entre la preferencia por soluciones dulces y la alta ingesta de EtOH (Bachmanov et al., 2011).

En la segunda fase de este experimento 2 se investigó el posible efecto de la manipulación de los niveles de NAS neonatales sobre la expresión del receptor 5-HT₃. Debe tenerse en cuenta que los resultados de este estudio son preliminares, ya que en el momento de presentar esta tesis doctoral sólo ha sido posible analizar la expresión del receptor 5-HT₃ de algunas estructuras. Observamos en cerebro postnatal temprano que los animales control exhibían un incremento en la expresión del receptor 5-HT₃ mesencefálico en PN12 comparado con PN6. En otras estructuras del SNC como el cerebelo, también se observa un pico en la expresión del receptor 5-HT₃ alrededor de la segunda

semana postnatal (Oostland et al., 2011; Oostland y Van Hooft, 2013), en la que este receptor participa en el control de la eliminación de fibras trepadoras cerebelares (Oostland et al., 2013).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que los animales administrados con allopregnanolona exhibían diferencias temporales en la expresión máxima del receptor 5-HT₃ de manera similar al grupo control, aunque produciéndose días antes (PN9). Además, el grupo tratado con finasteride también exhibió un patrón temporal distinto respecto a los otros grupos, ya que estos animales no presentaron diferencias en la expresión entre los días de extracción de las muestras. El receptor 5-HT₃ participa en el neurodesarrollo, y puede encontrarse en neuroblastos que migran hacia el estriado (núcleo accumbens) durante las tres primeras semanas de vida (Inta et al., 2008), y también se expresa en las interneuronas GABAérgicas del prosencéfalo en desarrollo (Engel et al., 2013). Así, la expresión alterada de este receptor podría provocar una modificación en la vía mesocorticolímbica afectando la búsqueda de la recompensa producida por drogas como el EtOH. Sin embargo, aunque obtuvimos efectos de los tratamientos neonatales en la expresión del receptor 5-HT₃ en el mesencéfalo de crías de rata, no observamos diferencias entre los distintos tratamientos neonatales en la expresión de este receptor en las muestras de estriado ventral adulto. Decidimos analizar, en primer lugar, el estriado ventral en edad adulta para comprobar los efectos obtenidos en estudios previos en que los animales exhibieron bajos niveles de serotonina y una mayor ratio de turnover (5-HIAA/serotonina) en esta estructura, indicando una posible disminución en la actividad serotoninérgica, ya que los niveles de su metabolito (5-HIAA) no incrementaron (Lidó et al., 2016a). Aunque no haya un efecto observable del

tratamiento neonatal con finasteride en la expresión del receptor 5-HT₃ en el estriado de rata adulta, sí que podría haberlo en otras estructuras importantes en el procesamiento de la búsqueda de recompensa en la adultez, como el ATV (mesencéfalo). Por tanto, otros estudios son necesarios para analizar la expresión o la función del receptor 5-HT₃ en ésta y otras estructuras cerebrales que puedan explicar por qué los animales tratados con finasteride son más sensibles a un fármaco antagonista selectivo de este receptor.

Discusión general: La participación de los NAS durante las etapas postnatal y adolescente tempranas en la vulnerabilidad al consumo de EtOH

El objetivo de este trabajo es evaluar los efectos de la manipulación de los niveles de NAS durante periodos críticos del neurodesarrollo, como la etapa postnatal y la adolescencia tempranas, en la vulnerabilidad al consumo de EtOH. En términos de vulnerabilidad, el neurodesarrollo temprano es una etapa crucial en la que pueden producirse cambios que aumenten el riesgo a consumir sustancias adictivas (Enoch, 2011). Además, como ya se ha comentado en diversos apartados, son varios los elementos que pueden influir en el consumo de drogas. En ese sentido, el consumo inicial es clave, así como los diferentes factores que lo precipitan. Dado que al manipular los niveles fisiológicos de NAS en etapas cruciales del neurodesarrollo a través de la administración de finasteride, se observa un aumento del consumo de EtOH (Llidó et al., 2016a; Llidó et al., 2016b), hipotetizamos que distintos factores de vulnerabilidad al

consumo de EtOH, como la sensibilidad a sus efectos estimulantes o una mayor preferencia por la novedad, podrían verse afectados por la manipulación de los niveles de NAS en el período neonatal y/o durante la adolescencia temprana. También hipotetizamos que esta manipulación podría estar alterando la maduración del sistema serotoninérgico a través del receptor 5HT3.

Esta hipótesis parece ser confirmada por los resultados obtenidos en el presente trabajo. Siguiendo la propuesta de que los efectos estimulantes motrices inducidos por sustancias adictivas activan el sistema dopaminérgico mesolímbico (Wise y Bozarth, 1987; Phillips y Shen, 1996; Söderpalm y Ericson, 2013) el cual está relacionado con la sensibilidad a la búsqueda de recompensa (Willuhn et al., 2010), y que esta respuesta inicial subjetiva al EtOH puede predecir el consumo voluntario y el riesgo de consumo abusivo de esta droga (Ray et al., 2010; King et al., 2011; Nentwig et al., 2017), sería razonable pensar que los efectos del tratamiento neonatal con finasteride sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices del EtOH y sobre el consumo inicial de esta droga estarían relacionados. No obstante, los animales tratados con finasteride presentaron un incremento del consumo inicial de EtOH, pero una disminución de la sensibilidad a sus efectos estimulantes motrices. Se ha sugerido que, aunque los mecanismos relacionados con los efectos estimulantes y motivacionales del EtOH pueden solaparse a nivel de ciertas dianas moleculares, no tienen porque ser exactamente los mismos (Brabant et al., 2014), y esto podría justificar la discrepancia entre nuestros resultados. De todas formas, ya que observamos que la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices de una dosis baja de EtOH disminuyó al administrar neonatalmente finasteride, podría ser que esta baja sensibilidad estuviera relacionada con una

menor sensibilidad al refuerzo/motivación inducidos por la droga (Wise y Bozarth, 1987; Phillips y Shen, 1996; Meyer et al., 2009; Söderpalm y Ericson, 2013), lo que podría indicar la presencia de un tono hipodopaminérgico en estos animales. Esta hipótesis estaría relacionada con los bajos niveles de dopamina observados en experimentos previos en animales tratados neonatalmente con finasteride, los cuales presentaban un mayor nivel de ingesta de EtOH (Llidó et al., 2016a; Llidó et al., 2016b), y estaría en la línea de aquellos trabajos que vinculan la inhibición dopaminérgica con una disminución en la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH (Brabant et al., 2014). Diversos estudios han demostrado que las ratas seleccionadas para expresar una alta preferencia por consumir EtOH presentan una menor inervación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico (Zhou et al., 1995; Casu et al., 2002) y niveles más bajos de dopamina en el núcleo accumbens comparado con ratas no preferidoras de esta droga (Murphy et al., 1982; McBride et al., 1995). Así, nuestros resultados junto con los datos de experimentos previos sugieren que los animales que presentan niveles más bajos de dopamina serían aquellos que exhiben una menor sensibilidad a los efectos estimulantes motrices del EtOH, los cuales consumirían mayores cantidades de EtOH, según la hipótesis hipodopaminérgica, para compensar la deficiencia en los niveles de dopamina mesolímbica (Blum et al., 1996; Blum et al., 2000; Febo et al., 2017).

Como ya se ha subrayado, uno de los receptores que controla la liberación de dopamina inducida por el EtOH es el receptor 5-HT₃. Tanto el EtOH, como la allopregnanolona a concentraciones altas, pueden actuar sobre este receptor (Lovinger, 1999; Deehan et al., 2016; Wetzel et al., 1998; Rupprecht, 2003; Giatti et al., 2018). Es la primera vez que se observa una modulación de los efectos de

un antagonista del receptor 5-HT₃ sobre el consumo inicial de EtOH mediante la manipulación neonatal de los niveles fisiológicos de NAS. Las ratas que han sido tratadas neonatalmente con un inhibidor de la enzima 5 α -reductasa parecen ser más sensibles al ondansetron, ya que este fármaco antagonista serotoninérgico 5-HT₃ reduce significativamente el consumo inicial de EtOH sólo en estos animales. Siguiendo la hipótesis hipodopaminérgica antes comentada, el ondansetron podría estar neutralizando las propiedades reforzantes del EtOH y disminuyendo la motivación por consumir la droga, ya que la liberación de dopamina mesolímbica sería demasiado baja en estos animales como para inducir la búsqueda del EtOH. Por otro lado, la alta sensibilidad al ondansetron exhibida por estos animales sugiere una posible alteración de los receptores 5-HT₃. El receptor 5-HT₃ regula la función cerebral y la formación de redes neurales durante el desarrollo, y ha sido localizado en el telencéfalo basal inmaduro, donde se generan interneuronas GABAérgicas neocorticales (Engel et al., 2013). Tanto en el neocortex como en el sistema límbico, los receptores 5-HT₃ se expresan en este tipo de interneuronas, las cuales son cruciales para controlar funciones fisiológicas del cerebro como la inhibición de la excitabilidad neuronal (Engel et al., 2013). Así, la manipulación de los niveles neonatales de NAS podría estar afectando tanto a los receptores 5-HT₃ como a la maduración de estas estructuras cerebrales, lo que, a su vez, podría llevar a una alteración en el valor reforzante y/o la motivación por consumir EtOH y por lo tanto en su ingesta. Los datos preliminares que hemos obtenido en nuestro estudio confirman parcialmente esta hipótesis, ya que observamos diferencias en el patrón temporal de la expresión del receptor 5-HT₃ según el tratamiento neonatal en el mesencéfalo de crías de rata. No obstante, los sujetos adultos no

presentaron diferencias en la expresión de este receptor en el estriado ventral, hecho que podría estar relacionado con la técnica utilizada (Western Blot), que es semicuantitativa y no ofrece un recuento exacto, ni permite la observación de otros parámetros. Sería necesario realizar más pruebas para analizar tanto las diferencias en la expresión del receptor 5-HT3 en otras estructuras importantes en el circuito de la motivación/recompensa, así como para estudiar la posible alteración estructural o funcional de este receptor.

En el experimento 2a se evaluó la NOP, ya que el rasgo de búsqueda de novedad ha sido relacionado tanto con el consumo como con el abuso de sustancias (Deroche-Gamonet y Piazza, 2014; Manzo et al., 2014; Belin et al., 2016). Los resultados mostraron que los animales tratados con finasteride presentaban un índice de preferencia más elevado por explorar un objeto nuevo vs. uno familiar. Así, este aumento en la preferencia por la novedad podría indicar que estos sujetos son más vulnerables a consumir sustancias adictivas, lo cual estaría relacionado con el aumento en el consumo de EtOH exhibido por estos animales. Por otro lado, como ya hemos comentado, en estudios previos hemos observado que los animales tratados neonatalmente con finasteride presentan tanto bajos niveles de conducta exploratoria como de actividad locomotriz respecto al grupo control (Darbra y Pallarés, 2010; Mòdol et al., 2013), sugiriendo que la administración neonatal de finasteride puede provocar un perfil de búsqueda de la novedad, pero no de sensaciones. No obstante, sería interesante realizar más pruebas de búsqueda de sensaciones para poder delimitar mejor un perfil de vulnerabilidad (búsqueda de sensaciones y/o novedad) junto con pruebas de consumo y abuso de sustancias.

El presente trabajo también muestra el importante papel que juegan los NAS durante la adolescencia, ya que la administración del principal precursor de la allopregnanolona (PROG) durante la adolescencia temprana (PN30) compensó el efecto del finasteride neonatal sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices del EtOH (experimento 1). Es sabido que la administración de PROG aumenta los niveles de allopregnanolona (Moran y Smith, 1998; Pisu et al., 2016). Así, un aumento de la allopregnanolona, como el que se daría en respuesta a situaciones de estrés agudo (Purdy et al., 1991; Barbaccia et al., 1996; Barbaccia et al., 1997; Cozzoli et al. 2014), podría neutralizar los efectos causados por la alteración de los niveles de NAS durante la etapa postnatal temprana. Estos resultados pueden relacionarse con procesos dinámicos que abarcan la adaptación funcional frente a la adversidad, conocido como resiliencia (Luthar y Zigler, 1991). Muchos estudios se han centrado en las experiencias adversas durante el desarrollo como un factor de riesgo, excluyendo la posibilidad de que en algunos casos pueden ser adaptativo en función del entorno adulto (Schmidt, 2011), ya que se ha observado que no todos los sujetos expuestos a experiencias estresantes desarrollan trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés (Carnevali et al., 2018)

En resumen, los resultados del presente trabajo exponen que los niveles fisiológicos de NAS en etapas cruciales del desarrollo podrían desempeñar un papel importante en la vulnerabilidad al consumo de EtOH, ya que la inhibición de la enzima 5 α -reductasa disminuye la sensibilidad a los efectos estimulantes del EtOH, aumenta la preferencia por la novedad, además de aumentar la sensibilidad a los efectos de un antagonista del receptor 5-HT₃ sobre el consumo inicial de EtOH. Por otro lado, el presente trabajo ha puesto de manifiesto que la

administración del precursor de la allopregnanolona, PROG, durante la adolescencia temprana puede ejercer un efecto protector sobre las alteraciones causadas por la manipulación de los niveles neonatales de NAS. Estos resultados ponen de relieve el importante papel de estas etapas del neurodesarrollo en la maduración del sistema nervioso y el comportamiento.

CONCLUSIONES

Experimento 1:

- La administración del principal precursor de allopregnanolona, PROG, durante la adolescencia temprana (PN30), induce un perfil de tipo ansiolítico en el EPM.
- La administración aguda de 0.5g/kg de EtOH produce un efecto estimulante sobre la actividad locomotora en el OF.
- La administración neonatal de finasteride reduce la sensibilidad a los efectos de una dosis estimulante motriz de EtOH comparado con los grupos control y el tratamiento con allopregnanolona (PN70).
- El efecto del tratamiento neonatal con finasteride sobre la sensibilidad a los efectos estimulantes motrices de 0.5g/kg de EtOH es neutralizado por la administración de PROG durante la adolescencia temprana.

Experimento 2a:

- La manipulación neonatal de los niveles de NAS a través de la administración de finasteride aumenta la preferencia por la novedad a través de la exploración de objetos nuevos, así como el consumo inicial de alcohol en la edad adulta.
- El grupo tratado con finasteride neonatal presenta una mayor sensibilidad a los efectos del ondansetron (0.1mg/kg) sobre el consumo inicial de EtOH, disminuyendo su ingesta.

Experimento 2b:

- La administración de allopregnanolona o finasteride durante la etapa neonatal parece alterar el patrón de expresión del receptor 5-HT3 neonatal comparado con el que se obtienen en los animales control.
- No hay diferencias en la expresión del receptor 5-HT3 provocadas por el tratamiento con ondansetron o el consumo de EtOH en edad adulta, ni en función del tratamiento neonatal.

Conclusión general: Los niveles de NAS en etapas cruciales del desarrollo, como la etapa postnatal y adolescencia tempranas, juegan un papel importante en la vulnerabilidad al consumo de EtOH, a través de factores de riesgo como la sensibilidad a los efectos estimulantes maternos, la preferencia por la novedad y el consumo inicial.

REFERENCIAS

Agís-Balboa, R.C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., Guidotti, A. (2006) Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(39):14602-7

Aguirre-Samudio, A.J., Nicolini, H. (2005) [DRD4 polymorphism and the association with mental disorders]. *Rev Invest Clin*. 57(1):65-75.

Alex, K.D., Pehek, E.A. (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther*. 113(2):296-320

Amalric M1, Koob GF. (1993) Functionally selective neurochemical afferents and efferents of the mesocorticolimbic and nigrostriatal dopamine system. *Prog Brain Res*. 99:209-26

Apter, D., Hermanson, E. (2002) Update on female pubertal development. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 14:475-81

Arnett, J. (1994) Sensation seeking: a new conceptualization and a new scale. *Pers Individ Differ*. 16:289-96

Azmitia, E.C. (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull*. 56:413-24

Bachmanov, A.A., Bosak, N.P., Floriano, W.B., Inoue, M., Li, X., Lin, C., Murovets, V.O., Reed, D.R., Zolotarev, V.A., Beauchamp, G.K. (2011) Genetics of sweet taste preferences. *Flavour Fragr J*. 26(4):286-94

Balthazart, J. (2017) Steroid metabolism in the brain: From bird watching to molecular biology, a personal journey. *Horm Behav*. 93:137-150

Balthazart, J., Choleris, E., Remage-Healey, L. (2018) Steroids and the brain: 50 years of research, conceptual shifts and the ascent of non-classical and membrane-initiated actions. *Horm Behav*. 99:1-8

Barbaccia, M.L., Roscetti, G., Trabucchi, M., Mostallino, M.C., Concas, A., Purdy, R.H., Biggio, G. (1996) Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABA_A receptor function after acute stress. *Neuroendocrinology*. 63:166-72

Barbaccia, M.L., Roscetti, G., Trabucchi, M., Purdy, R.H., Mostallino, M.C., Concas, A., Biggio, G. (1997) The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations. *Br J Pharmacol*. 120:1582-88

Barbaccia, M.L., Affricano, D., Trabucchi, M., Purdy, R.H., Colombo, G., Agabio, R., Gessa, G.L. (1999) Ethanol markedly increases GABAergic neurosteroids in alcohol-preferring rats. *Eur J Pharmacol*. 384(2-3):R1-2

- Barbaccia, M.L. (2004) Neurosteroidogenesis: relevance to neurosteroid actions in brain and modulation by psychotropic drugs. *Crit Rev Neurobiol.* 16(1–2):67-74
- Banati, R.B., Middleton, R.J., Chan, R., Hatty, C.R., Kam, W.W., Quin, C., Graeber, M.B., Parmar, A., Zahra, D., Callaghan, P., Fok, S., Howell, N.R., Gregoire, M., Szabo, A., Pham, T., Davis, E., Liu, G.J. (2014) Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSP0 knockout. *Nat Commun.* 5:5452
- Barbayannis, G., Franco, D., Wong, S., Galdamez, J., Romeo, R.D., Bauer, E.P. (2017) Differential effects of stress on fear learning and activation of the amygdala in pre-adolescent and adult male rats. *Neuroscience.* 360:210-219
- Barker, J.M., Zhang, H., Villafane, J.J., Wang, T.L., Torregrossa, M.M., Taylor, J.R. (2014) Epigenetic and pharmacological regulation of 5HT₃ receptors controls compulsive ethanol seeking in mice. *Eur J Neurosci.* 39(6): 999-1008
- Barnes, N.M., Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38:1083-152
- Barron, A.M., Ji, B., Kito, S., Suhara, T., Higuchi, M. (2018) Steroidogenic abnormalities in translocator protein knockout mice and significance in the aging male. *Biochem J.* 475(1):75-85
- Barros, V.G., Rodriguez, P., Martijena, I.D., Perez, A., Molina, V.A., Antonelli, M.C. (2006) Prenatal stress and early adoption effects on benzodiazepine receptors and anxiogenic behavior in the adult rat brain. *Synapse* 60:609-18
- Baulieu, E.E. (1981) Steroid hormones in the brain: several mechanisms. *En: Fuxe, K., Gustafson, J.A., Wetterberg, L. (Eds.), Steroid Hormone regulation of the brain.* Pergamon, Elmsford, NY, pp. 3-14.
- Baulieu, E.E. (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology.* 23:963-87.
- Beardsley, P.M., Lopez, O.T., Gullikson, G., Flynn, D. (1994) Serotonin 5-HT₃ antagonists fail to affect ethanol self-administration of rats. *Alcohol.* 11(5):389-95
- Belelli, D., Bolger, M.B., Gee, K.W. (1989) Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 α -pregnan-3 α -ol-20-one, *Eur J Pharmacol.* 166:325-29
- Belelli, D., Lambert, J.J. (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(7):565-75.
- Belin, D., Mar, A.C., Dalley, J.W., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2008) High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. *Science* 320:1352-5
- Belin, D., Berson, N., Balado, E., Piazza, P.V., Deroche-Gamonet, V. (2001) High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration, *Neuropsychopharmacology.* 36:569-79

Belin, D., Deroche-Gamonet, V. (2012) Responses to novelty and vulnerability to cocaine addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(11). pii: a011940

Belin, D., Belin-Rauscent, A., Everitt, B.J., Dalley, J.W. (2016) In search of predictive endophenotypes in addiction: insights from preclinical research. *Genes Brain Behav.* 15(1):74-88

Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R., Khazipov, R. (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev.* 87:1215-84

Ben-Ari, Y., Khalilov, I., Kahle, K.T., Cherubini, E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist.* 18(5):467-86

Bergeron, R., de Montigny C., Debonnel, G. (1996) Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci.* 16(3):1193-202

Bernardi, F., Salvestroni, C., Casarosa, E., Nappi, R.E., Lanzone, A., Luisi, S., Purdy, R.H., Petraglia, F., Genazzani, A.R. (1998) Aging is associated with changes in allopregnanolone concentrations in brain, endocrine glands and serum in male rats. *Eur J Endocrinol.* 138(3):316-21

Berretti, R., Santoru, F., Locci, A., Sogliano, C., Calza, A., Choleris, E., Porcu, P., Concas, A. (2014) Neonatal exposure to estradiol decreases hypothalamic allopregnanolone concentrations and alters agonistic and sexual but not affective behavior in adult female rats. *Horm Behav.* 65:142-53

Berridge, K.C., Robinson, T.E. (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci.* 26:507-13

Binder, E.B., Bradley, R.G., Liu, W., Epstein, M.P., Deveau, T.C., Mercer, K.B., Tang, Y., Gillespie, C.F., Heim, C.M., Nemeroff, C.B., Schwartz, A.C., Cubells, J.F., Ressler, K.J. (2008) Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA.* 299(11):1291-305

Blakley, G., Pohorecky, L.A. (2006) Psychosocial stress alters ethanol's effect on open field behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 84(1):51-61

Blanchard, M.M., Mendelsohn, D., Stamp, J.A. (2009) The HR/LR model: Further evidence as an animal model of sensation seeking. *Neurosci Biobehav Rev.* 33(7):1145-54

Blum, K., Sheridan, P.J., Wood, R.C., Braverman, E. R., Chen, T.J., Cull, J.G., Comings, D.E. (1996) The D2 dopamine receptor gene as a determinant of reward deficiency syndrome. *J R Soc Med.* 89(7):396-400.

Blum, K., Braverman, E.R., Holder, J.M., Lubar, J.F., Monastra, V.J., Miller, D. Lubar, J.O., Chen, T.J., Comings, D.E. (2000) Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors. *J Psychoactive Drugs*. 32 Suppl: i-iv, 1-112

Blume, S.R., Nam, H., Luz, S., Bangasser, D.A., Bhatnagar, S. (2018) Sex- and Age-dependent Effects of Orexin 1 Receptor Blockade on Open-Field Behavior and Neuronal Activity. *Neuroscience*. 381:11-21

Bock, J., Rether, K., Gröger, N., Xie, L., Braun, K. (2014) Perinatal programming of emotional brain circuits: an integrative view from systems to molecules. *Front Neurosci*. 8:11

Borg, S., Kvande, H., Liljeberg, P., Mossberg, D., Valverius, P. (1985) 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid in alcoholic patients under different clinical conditions. *Alcohol*. 2:415-8

Brabant, C., Guarnieri, D.J., Quertemont, E. (2014) Stimulant and motivational effects of alcohol: lessons from rodent and primate models. *Pharmacol Biochem Behav*. 122:37-52

Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., Gillespie, C.F., Berg, T., Evces, M., Newport, D.J., Stowe, Z.N., Heim, C.M., Nemeroff, C.B., Schwartz, A., Cubells, J.F., Ressler, K.J. (2008) Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry*. 65(2):190-200

Brunton, P.J., Russell, J.A., Hirst, J.J. (2014) Allopregnanolone in the brain: protecting pregnancy and birth outcomes. *Prog Neurobiol*. 113:106-36

Buchanan, C.M., Eccles, J.S., Becker, J.B. (1992) Are adolescents the victims of raging hormones: evidence for activational effects of hormones on moods and behavior at adolescence. *Psychol Bull*. 111:62-107

Bullock, A.E., Clark, A.L., Grady, S.R., Robinson, S.F., Slobe, B.S., Marks, M.J., Collins, A.C. (1997) Neurosteroids modulate nicotinic receptor function in mouse striatal and thalamic synaptosomes. *Send to J Neurochem*. 68(6):2412-23

Cain, M.E., Saucier, D.A., Bardo, M.T. (2005) Novelty seeking and drug use: contribution of an animal model. *Exp Clin Psychopharmacol*. 13:367-75

Calza, A., Sogliano, C., Santoru, F., Marra, C., Angioni, M.M., Mostallino, M.C., Biggio, G., Concas, A. (2010) Neonatal exposure to estradiol in rats influences neuroactive steroid concentrations, GABAA receptor expression, and behavioral sensitivity to anxiolytic drugs. *J Neurochem*. 113:1285-95

Campbell, A.D., McBride, W.J. (1995) Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav*. 51:835-42

- Campbell, A.D., Kohl, R.R., McBride, W.J. (1996) Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated somatodendritic dopamine release. *Alcohol*. 13:569-74
- Carnevali, L., Koenig, J., Sgoifo, A., Ottaviani, C. (2018) Autonomic and brain morphological predictors of stress resilience. *Front Neurosci*. 12:228
- Carr, K.D. (2011) Food scarcity, neuroadaptations, and the pathogenic potential of dieting in an unnatural ecology: binge eating and drug abuse. *Physiol Behav*. 104(1):162-7
- Carta, M.G., Bhat, K.M., Preti, A. (2012) GABAergic neuroactive steroids: a new frontier in bipolar disorders. *Behav Brain Func*. 8:61
- Casey, K.F., Benkelfat, C., Cherkasova, M.V., Baker, G.B., Dagher, A., Leyton, M. (2014) Reduced dopamine response to amphetamine in subjects at ultra high risk for addiction. *Biol Psychiatry*. 76:23-30
- Casu, M.A., Dinucci, D., Colombo, G., Gessa, G.L., Pani, L. (2002) Reduced DAT- and DBH-immunostaining in the limbic system of Sardinian alcohol-preferring rats. *Brain Res*. 948(1-2):192-202
- Chen, Y., Baram, T.Z. (2016) Toward Understanding How Early-Life Stress Reprograms Cognitive and Emotional Brain Networks. *Neuropsychopharmacology*. 41(1):197-206.
- Chisari, M., Eisenman, L.N., Covey, D.F., Mennerick, S., Zorumski, C.F. (2010) The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors. *Trends Neurosci*. 33(7):299-306
- Chubakov, A.R., Gromova, E.A., Konovalov, G.V., Sarkisova, E.F., Chumasov, E.I. (1986) The effects of serotonin on the morpho-functional development of rat cerebral neocortex in tissue culture. *BrainRes*. 369:285-97
- Chuck, T.L., McLaughlin, P.J., Arizzi-LaFrance, M.N., Salamone, J.D., Correa, M. (2006) Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci*. 79(2):154-61
- Clancy, B., Finlay, B.L., Darlington, R.B., Anand, K.J. (2007) Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 28(5):931-7
- Clause, B.T. (1998) The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. *Mendel Newsl*. (7):2-7
- Cloninger, C.R., Svrakic, D.M., Przybeck, T.R. (1993) A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry*. 50:975-90

- Concas, A., Mostallino, M.C., Porcu, P., Follesa, P., Barbaccia, M.L., Trabucchi, M., Purdy, R.H., Grisenti, P., Biggio, G. (1998) Role of brain allopregnanolone in the plasticity of gamma-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(22):13284-9
- Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., Baulieu, E.E. (1981) Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78(8):4704-7
- Corpéchet, C., Collins, B., Carey, M., Tsouros, A., Robel, P., Fry, J. (1997) Brain neurosteroids during the mouse oestrous cycle. *Brain Res*. 766:276-80
- Cozzoli, D.K., Tanchuck-Nipper, M.A., Kaufman, M.N., Horowitz, C.B., Finn, D.A. (2014) Environmental stressors influence limited-access ethanol consumption by C57BL/6J mice in a sex-dependent manner. *Alcohol*. 48:741-54
- Creese, I., Sibley, D.R., Leff, S., Hamblin, M. (1981) Dopamine receptors: subtypes, localization and regulation. *Fed Proc*. 40(2):147-52
- Dalley, J.W., Fryer, T.D., Brichard, L., Robinson, E.S., Theobald, D.E., Lääne, K., Peña, Y., Murphy, E.R., Shah, Y., Probst, K., Abakumova, I., Aigbirhio, F.I., Richards, H.K., Hong, Y., Baron, J.C., Everitt, B.J., Robbins, T.W. (2007) Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science*. 315(5816):1267-70
- Darbra, S., Pallarès, M. (2009) Neonatal allopregnanolone increases novelty-directed locomotion and disrupts behavioural responses to GABA(A) receptor modulators in adulthood. *Int J Dev Neurosci*. 27(6):617-25
- Darbra, S., Pallarès, M. (2010) Alterations in neonatal neurosteroids affect exploration during adolescence and prepulse inhibition in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*. 35(4):525-35
- Darbra, S., Pallarès, M. (2012) Effects of early postnatal allopregnanolone administration on elevated plus maze anxiety scores in adult male Wistar rats. *Neuropsychobiology*. 65(1):20-7
- Darbra, S., Mòdol, L., Llidó, A., Casas, C., Vallée, M., Pallarès, M. (2014) Neonatal allopregnanolone levels alteration: effects on behavior and role of the hippocampus. *Prog Neurobiol*. 113:95-105
- Daubert, E.A., Condrón, B.G. (2010) Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. *Trends Neurosci*. 33:424-434
- De Deurwaerdère, P., Moison, D., Navailles, S., Porrás, G., Spampinato, U. (2005) Regionally and functionally distinct serotonin3 receptors control in vivo dopamine outflow in the rat nucleus accumbens. *J Neurochem*. 94(1):140-9

- Deehan, G.A. Jr., Knight, C.P., Waeiss, R.A., Engleman, E.A., Toalston, J.E., McBride, W.J., Hauser, S.R., Rodd, Z.A. (2016) Peripheral administration of ethanol results in a correlated increase in dopamine and serotonin within the posterior ventral tegmental area. *Alcohol Alcohol.* 51(5):535-40
- Dehorter, N., Michel, F.J., Marissal, T., Rotrou, Y., Matrot, B., Lopez, C., Humphries, M.D. & Hammond, C. (2011) Onset of pup locomotion coincides with loss of NR2C / D-mediated cortico-striatal EPSCs and dampening of striatal network immature activity. *Front. Cell. Neurosci.* 5:24
- Dehorter, N., Vinay, L., Hammond, C., Ben-Ari, Y. (2012) Timing of developmental sequences in different brain structures: physiological and pathological implications. *Eur J Neurosci.* 35(12):1846-56
- dela Peña, I., Gonzales, E.L., delaPeña, J.B., Kimc, B-N., Hand, D.H., Shinb, C.Y., Cheonga, J.H. (2015) Individual differences in novelty-seeking behavior in spontaneously hypertensive rats: Enhanced sensitivity to the reinforcing effect of methylphenidate in the high novelty-preferring subpopulation. *J Neuroci Meth.* 252:48-54
- Dellu, F., Piazza, P.V., Mayo, W., Le Moal, M., Simon, H. (1996) Novelty-seeking in rats--Biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology.* 34:136-45
- Deroche-Gamonet, V., Piazza, P.V. (2010) Transition to addiction. *En: Koob GF, Le Moal M, Thompson EB (eds) Encycl. Behav. Neurosci. Academic, Oxford, pp. 422-8*
- Deroche-Gamonet, V., Piazza, P.V. (2012) Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control, *Neuropharmacology.* 76:437-44
- Deroche-Gamonet, V., Piazza, P.V. (2014) Psychobiology of cocaine addiction: Contribution of a multi-symptomatic animal model of loss of control. *Neuropharmacology.* 76Pt B:437-49
- Dess, N.K., Badia-Elder, N.E., Thiele, T.E., Kiefer, S.W., Blizard, D.A. (1998) Ethanol consumption in rats selectively bred for differential saccharin intake. *Alcohol.* 16:275-8
- Di Matteo, V., Di Giovanni, G., Di Mascio, M., Esposito, E., (1999) SB 242 084 a selective serotonin_{2C} receptor antagonist increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropharmacology.* 38(8):1195-205
- Di Matteo, V., Cacchio, M., Di Giulio, C., Esposito, E. (2002) Role of serotonin_{2C} receptors in the control of brain dopaminergic function. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):727-34

- Ding, Z.M., Toalston, J.E., Oster, S.M., McBride, W.J., Rodd, Z.A. (2009) Involvement of local serotonin-2A but not serotonin-1B receptors in the reinforcing effects of ethanol within the posterior ventral tegmental area of female Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 204(3):381-90
- Dooley, A.E., Pappas, I.S., Parnavelas, J.G. (1997) Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro. *Exp Neurol*. 148:205-14
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., Tonon, M.C., Pelletier, G., Vaudry, H. (2009) Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 30:259-301
- Doremus-Fitzwater, T.L., Barreto, M., Spear, L.P. (2012) Age-related differences in impulsivity among adolescent and adult Sprague-Dawley rats. *Behav Neurosci*. 126(5):735-41
- Droogleever Fortuyn H.A., van Broekhoven, F., Span, P.N., Bäckström, T., Zitman, F.G., Verkes, R.J. (2004) Effects of PhD examination stress on allopregnanolone and cortisol plasma levels and peripheral benzodiazepine receptor density. *Psychoneuroendocrinology*. 29(10):1341-4
- Duluwa, S.C., Grandy, D.K., Low, M.J., Paulus, M.P., Geyer, M.A. (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci*. 19(21):9550-6
- Ellenbroek, B.A., Cools, A.R. (2002) Early maternal deprivation and prepulse inhibition: The role of postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav*. 73(1):177-84
- Engel, M., Smidt, M.P., van Hooft, J.A. (2013) The serotonin 5HT3 receptor: a novel neurodevelopmental target, *Front. Cell. Neurosci*. 7:76
- Ennaceur, A. (2010) One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 215:244-54
- Enoch, M. A. (2011) The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology (Berl)*. 214(1):17-31
- Ersche, K.D., Williams, G.B., Robbins, T.W., Bullmore, E.T. (2013) Meta-analysis of structural brain abnormalities associated with stimulant drug dependence and neuroimaging of addiction vulnerability and resilience. *Curr Opin Neurobiol*. 23:615-24
- Evenden, J.L. (1999) Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)*. 146:348-61

Fadalti, M., Petraglia, F., Luisi, S., Bernardi, F., Casarosa, E., Ferrari, E., Luisi, M., Saggese, G., Genazzani, A.R., Bernasconi, S. (1999) Changes of serum allopregnanolone levels in the first two years of life and during pubertal development. *Pediatr Res* 46:323-27

Fadda, F., Garau, B., Marchei, F., Colombo, G., Gessa, G.L. (1991) MDL 72222, a selective 5-HT₃ receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rat. *Alcohol Alcohol*. 26:107-10

Febo, M., Blum, K., Badgaiyan, R.D., Baron, D., Thanos, P.K., Colon-Perez, L.M., Demortovics, Z., Gold, M.S. (2017) Dopamine homeostasis: brain functional connectivity in reward deficiency syndrome. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 22:669-91

Fine, R., Zhang, J., Stevens, H.E. (2014) Prenatal stress and inhibitory neuron systems: implications for neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 19(6):641-51

Fischer, A.G., Endrass, T., Goebel, I., Reuter, M., Montag, C., Kubisch, C., Ullsperger, M. (2015) Interactive effects of citalopram and serotonin transporter genotype on neural correlates of response inhibition and attentional orienting. *Neuroimage*. 116:59-67

Flagel, S.B., Robinson, T.E., Clark, J.J., Clinton, S.M., Watson, S.J., Seeman, P., Phillips, P.E., Akil, H. (2010) An animal model of genetic vulnerability to behavioral disinhibition and responsiveness to reward-related cues: implications for addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35:388-400

Flagel, S.B., Waselus, M., Clinton, S.M., Watson, S.J., Akil, H. (2014) Antecedents and consequences of drug abuse in rats selectively bred for high and low response to novelty. *Neuropharmacology*. 76Pt B:425-36

Fodor, L., Boros, A., Dezso, P., Maksay, G. (2006) Expression of heteromeric glycine receptor-channels in rat spinal cultures and inhibition by neuroactive steroids. *Neurochem Int*. 49(6):577-83

Ford, M.M., Nickel, J.D., Phillips, T.J., Finn, D.A. (2005) Neurosteroid modulators of GABA(A) receptors differentially modulate ethanol intake patterns in male C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 29(9):1630-40

Ford, M.M., Mark, G.P., Nickel, J.D., Phillips, T.J., Finn, D.A. (2007) Allopregnanolone influences the consummatory processes that govern ethanol drinking in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*. 179(2):265-72

Ford, M.M., Nickel, J.D., Kaufman, M.N., Finn, D.A. (2015) Null mutation of 5 α -reductase type I gene alters ethanol consumption patterns in a sex-dependent manner. *Behav Genet*. 45(3):341-53

Ford, M.M., Beckley, E.H., Nickel, J.D., Eddy, S., Finn, D.A. (2008) Ethanol intake patterns in female mice: Influence of allopregnanolone and the inhibition of its synthesis. *Drug Alcohol Depend.* 97:73-85.

Foulds, J.A., Boden, J.M., Newton-Howes, G.M., Mulder, R.T., Horwood, L.J. (2017) The role of novelty seeking as a predictor of substance use disorder outcomes in early adulthood. *Addiction.* 112(9):1629-37

Fride, E., Dan, Y., Feldon, J., Halevy, G., Weinstock, M., (1986) Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol. Behav.* 37:681-87

Frye, C.A. (1995) The neuroactive steroid $3\alpha,5\alpha$ -THP has anti-seizure and possible neuroprotective effects in an animal model of epilepsy, *Brain Res.* 696:113-20

Frye, C.A., Paris, J.J., Walf, A.A., Rusconi, J.C. (2011a) Effects and mechanisms of $3\alpha,5\alpha$ -THP on emotion, motivation, and reward functions involving pregnane xenobiotic receptor. *Front Neurosci.* 5:136

Frye, C.A., Hirst, J.J., Brunton, P.J., Russell, J.A. (2011b) Neurosteroids for a successful pregnancy. *Stress.* 14(1):1-5

Gee, K.W. (1988) Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore. *Mol Neurobiol.* 2(4):291-317

Giatti, S., Garcia-Segura, L.M., Barreto, G.E., Melcangi, R.C. (2018) Neuroactive steroids, neurosteroidogenesis and sex. *Prog Neurobiol.* pii: S0301-0082(18)30008-X

Gililand-Kaufman, K.R., Tanchuck, M.A., Ford, M.M., Crabbe, J.C., Beadles-Bohling, A.S., Snelling, C., Mark, G.P., Finn, D.A. (2008) The neurosteroid environment in the hippocampus exerts bi-directional effects on seizure susceptibility in mice. *Brain Res.* 1243:113-123.

Gizerian, S.S., Morrow, A.L., Lieberman, J.A., Grobin, A.C. (2004) Neonatal neurosteroid administration alters parvalbumin expression and neuron number in medial dorsal thalamus of adult rats. *Brain Res.* 1012(1-2):66-74

Gizerian, S.S., Moy, S.S., Lieberman, J.A., Grobin, A.C. (2006) Neonatal neurosteroid administration results in development-specific alterations in prepulse inhibition and locomotor activity: neurosteroids alter prepulse inhibition and locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl).* 186(3):334-42

Gosnell, B.A., Krahn, D.D., (1992) The relationship between saccharin and alcohol intake in rats. *Alcohol.* 9:201-6

Grobin, A.C., Matthews, D.B., Devaud, L.L., Morrow, A.L. (1998) The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. *Psychopharmacology.* 139:2-19

Grobin, A.C., Morrow, A.L. (2001) 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one levels and GABA(A) receptor-mediated ³⁶Cl(-) flux across development in rat cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 131(1-2):31-9

Grobin, A.C., Heenan, E.J., Lieberman, J.A., Morrow, A.L. (2003) Perinatal neurosteroid levels influence GABAergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. *J Neurosci.* 23(5):1832-9

Gubner, N.R., McKinnon, C.S., Phillips, T.J. (2014) Effects of varenicline on ethanol-induced conditioned place preference, locomotor stimulation, and sensitization. *Alcohol Clin Exp Res.* 38(12):3033-42

Gulinello, M., Gong, Q.H., Smith, S.S. (2002) Progesterone withdrawal increases the α 4 subunit of the GABA(A) receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology - a comparison with female rats. *Neuropharmacology.* 43(4):701-14

Gunn, B.G., Cunningham, L., Mitchell, S.G., Swinny, J.D., Lambert, J.J., Belelli, D. (2015) GABAA receptor-acting neurosteroids: a role in the development and regulation of the stress response. *Front Neuroendocrinol* 36:28-48

Gustafsson, L., Nylander, I. (2006) Time-dependent alterations in ethanol intake in male wistar rats exposed to short and prolonged daily maternal separation in a 4-bottle free-choice paradigm. *Alcohol Clin Exp Res.* 30(12):2008-16

Hansen, S., Fahlke, C., Hard, E., Engel, J.A. (1994) Adrenal corticosteroids modulate the consumption of ethanol in the rat, in strategies for studying brain disorders: depressive, anxiety and drug abuse disorders (Palomo T, Archer T eds), pp 465–479. Farand Press, London.

Hayward, C., Sanborn, K. (2002) Puberty and the emergence of gender differences in psychopathology. *J Adolesc Health* 30S:49-58

Heilig, M., Egli, M. (2006) Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther.* 111(3):855-76

Heilig, M., Goldman, D., Berrettini, W., O'Brien, C.P. (2011) Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nat Rev Neurosci.* 12(11):670-84

Heitland, I., Kenemans, J.L., Oosting, R.S., Baas, J.M., Böcker, K.B. (2013) Auditory event-related potentials (P3a, P3b) and genetic variants within the dopamine and serotonin system in healthy females. *Behav Brain Res.* 249:55-64

Hirani, K., Sharma, A.N., Jain, N.S., Ugale, R.R., Chopde, C.T. (2005) Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 180:267-78

Hirst, J.J., Kelleher, M.A., Walker, D.W., Palliser, H.K. (2014) Neuractive steroids in pregnancy: key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 139:144-53

Hirst, J.J., Cumberland, A.L., Shaw, J.C., Bennett, G.A., Kelleher, M.A., Walker, D.W., Palliser, H.K. (2016) Loss of neurosteroid-mediated protection following stress during fetal life. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 160:181-8

Holdstock, L., King, A.C., de Wit, H. (2000) Subjective and objective responses to ethanol in moderate/heavy and light social drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 24(6):789-94

Hooks, M.S., Jones, G.H., Smith, A.D., Neill, D.B., Justice Jr., J.B., (1991) Response to novelty predicts the locomotor and nucleus accumbens dopamine response to cocaine. *Synapse.* 91:121-28

Hooks, M.S., Juncos, J.L., Justice Jr., J.B., Meiergerd, S.M., Povlock, S.L., Schenk, J.O., Kalivas, W. (1994) Individual locomotor response to novelty predicts selective alterations in D1 and D2 receptors and mRNAs. *J Neurosci.* 14 (10):6144-52

Hopper, B.R., Yen, S.C. (1975) Circulating concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate during puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 40:458-461

Hsu, F.C., Smith, S.S. (2003) Progesterone withdrawal reduces paired-pulse inhibition in rat hippocampus: Dependence on GABA-A receptor alpha-4 upregulation. *J Neurophysiol.* 89:186-198

Imamura, M., Prasad, C. (1998) Modulation of GABA-gated chloride ion influx in the brain by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *Biochem Biophys Res Commun.* 243(3):771-5

Inta, D., Alfonso, J., von Engelhardt, J., Kreuzberg, M.M., Meyer, A. H., van Hooft, J.A., Monyer, H. (2008) Neurogenesis and wide spread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:20994-99

Ismail, F.Y., Fatemi, A., Johnston, M.V. (2017) Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *Eur J Paediatr Neurol.* 21(1):23-48.

Iughetti, L., Predieri, B., Cobellis, L., Luisi, S., Luisi, M., Forese, S., Petraglia, F., Bernasconi, S. (2002) High serum allopregnanolone levels in girls with precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(5):2262-5

Iughetti, L., Predieri, B., Luisi, S., Casarosa, E., Bernasconi, S., Petraglia, F. (2005) Low serum allopregnanolone levels in girls with precocious pubarche. *Steroids.* 70(10):725-31

Janak, P.H., Redfern, J.E., Samson, H.H. (1998) The reinforcing effects of ethanol are altered by the endogenous neurosteroid, allopregnanolone. *Alcohol Clin Exp Res.* 22:1106-12

Janis, G.C., Devaud, L.L., Mitsuyama, H., Morrow, A.L. (1998) Effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on the neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one in male and female rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 22:2055-61

Johnson, B.A., Roache, J.D., Javors, M.A., DiClemente, C.C., Cloninger, C.R., Prihoda, T.J., Bordnick, P.S., Ait-Daoud, N., Hensler, J. (2000) Ondansetron for reduction of drinking among biologically predisposed alcoholic patients: a randomized controlled trial. *JAMA.* 284:963-71

Johnston, M.V. (2004) Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev.* 26(2):73-80

Jones, H.J., Gage, S.H., Heron, J., Hickman, M., Lewis, G., Munafò, M.R., Zammit, S. (2018) Association of combined patterns of tobacco and cannabis use in adolescence with psychotic experiences. *JAMA Psychiatry.* 75(3):240-246

Kabbaj, M. (2004) Neurobiological bases of individual differences in emotional and stress responsiveness. *Arch Neurol.* 61:1009-12

Kahn, A., Berger, R.G., deCatanzaro, D. (2008) The onset of puberty in female mice as reflected in urinary steroids and uterine/ovarian mass: interactions of exposure to males, phytoestrogen content of diet, and anogenital distance. *Reproduction.* 235:99-106

Karlsson, O., Roman, E. (2016) Dose-dependent effects of alcohol administration on behavioral profiles in the MCSF test. *Alcohol.* 50:51-6

Kelland, M.D., Freeman, A.S., Chiodo, L.A. (1990) Serotonergic afferent regulation of the basic physiology and pharmacological responsiveness of nigrostriatal dopamine neurons. *Pharmacol Exp Ther.* 253:803-11

Kellogg, C.K., Frye C.A. (1999) Endogenous levels of 5 α -reduced progestions and androgens in fetal vs. adult rat brains, *Brain Res Dev Brain Res.* 115(1):17-24

Kellogg, C.K., Kenjarski, T.P., Pleger, G.L., Frye, C.A. (2006) Region-, age-, and sex-specific effects of fetal diazepam exposure on the postnatal development of neurosteroids. *Brain Res.* 1067(1):115-25

King, A.C., Houle, T., de Wit, H., Holdstock, L., Schuster, A. (2002) Biphasic alcohol response differs in heavy versus light drinkers. *Alcohol Clin Exp Res.* 26(6):827-35

King, A.C., de Wit, H., McNamara, P.J., Cao, D. (2011) Rewarding, stimulant, and sedative alcohol responses and relationship to future binge drinking. *Arch Gen Psychiatry*. 68(4):389-99

Klebaur, J.E., Bevins, R.A., Segar, T.M., Bardo, M. (2001) Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav Pharmacol*. 12:267-75

Knapp, D.J., Pohorecky, L.A. (1992) Zacopride, a 5-HT₃ receptor antagonist, reduces voluntary ethanol consumption in rats, *Pharmacol. Biochem Behav*. 41(4):847-50

Kokate, T.G., Svensson, B.E., Rogawski, M.A. (1994). Anticonvulsant activity of neurosteroids: Correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 270(3):1223-9

Koros, E., Piasecki, J., Kostowski, W., Bienkowski, P. (1998) Saccharin drinking rather than open field behavior predicts initial ethanol acceptance in Wistar rats. *Alcohol*. 33:131-40

Kussius, C.L., Kaur, N., Popescu, G.K. (2009) Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *J Neurosci*. 29(21):6819-27

Lacapere, J.J., Papadopoulos, V. (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids*. 68:569-85

Lambert, J.J., Belelli, D., Hill-Venning, C., Peters, J.A. (1995) Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Sci*. 16(9):295-303.

Landgren, S.O. (1991) Pregnanolone (3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnane-20-one), a progesterone metabolite, facilitates inhibition of synaptic transmission in the Schäffer collateral pathway of the guinea pig hippocampus in vitro. *Epilepsy Res*. 10(2-3):156-65

Lauder, J.M. (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci*. 600:297-313

Lavdas, A.A., Blue, M.E., Lincoln, J., Parnavelas, J.G. (1997). Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 17:7872-880

Laviola, G., Macrì, S., Morley-Fletcher, S., Adriani, W. (2003) Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev*. 27:19-31

Lê, A.D., Funk, D., Harding, S., Juzysch, W., Fletcher, P.J., Shaham, Y. (2006) Effects of dexfenfluramine and 5-HT₃ receptor antagonists on stress-induced reinstatement of alcohol seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 186(1):82-92

Leccese, A.P., Lyness, W.H. (1984) The effects of putative 5-hydroxytryptamine receptor active agents on D-amphetamine self-administration in controls and rats with 5,7-dihydroxytryptamine median forebrain bundle lesions. *Brain Res.* 303(1):153-62

Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zaghera, E., Fishell, G., Rudy, B. (2010) The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci.* 30:16796-808

Lee, P., Flagel, S., Slusky, R., Akil, H. (2011) Selectively Bred High-responder and Lowresponder Rats Differ in “affective” Responsiveness to a Free-choice Noveltyseeking Test. Society for Neuroscience Annual Meeting, Washington, D.C.

Le Mellédo, J.M., Baker, G.B. (2002) Neuroactive steroids and anxiety disorders. *J Psychiatry Neurosci.* 27:161–5.

Leyton, M., Vezina, P. (2014) Dopamine ups and downs in vulnerability to addictions: a neurodevelopmental model. *Trends Pharmacol Sci.* 35:268-76

Liu, W., Thielen, R.J., Rodd, Z.A., McBride, W.J. (2006) Activation of serotonin-3 receptors increases dopamine release within the ventral tegmental area of Wistar and alcohol-preferring (P) rats. *Alcohol.* 40:167-76

Llidó, A., Mòdol, L., Darbra, S., Pallarès, M. (2013) Interaction between neonatal allopregnanolone administration and early maternal separation: effects on adolescent and adult behaviors in male rat. *Horm Behav.* 63(4):577-85

Llidó, A., Bartolomé, I., Darbra, S., Pallarès, M. (2016a) Effects of neonatal allopregnanolone manipulations and early maternal separation on adult alcohol intake and monoamine levels in ventral striatum of male rats. *Horm Behav.* 82:11-20

Llidó, A., Bartolomé, I., Darbra, S., Pallarès, M. (2016b) Neonatal finasteride administration decreases DA release in nucleus accumbens after alcohol and food presentation in adult male rats. *Behav Brain Res.* 309:44-50

Loh, E.A., Roberts, D.C.S. (1990) Break-points on a progressive ratio Schedule reinforced by intravenous cocaine increase following depletion of forebrain serotonin. *Psychopharmacology* 101(2):262-66

Lovinger, D.M. (1999) 5HT3 receptors and the neural actions of alcohols: an increasingly exciting topic, *Neurochem. Int.* 35:125-130

Luna, B., Marek, S., Larsen, B., Tervo-Clemmens, B., Chahal, R. (2015) An integrative model of the maturation of cognitive control, *Annu. Rev. Neurosci.* 38:151-70

Luthar S.S., Zigler E. (1991) Vulnerability and competence: a review of research on resilience in childhood. *Am J Orthopsychiatry*. 61(1):6-22

Lyness, W.H., Friede, N.M., Moore, K.E. (1980) Increased self-administration of Damphetamine after destruction of 5 hydroxytryptaminergic neurons. *Pharmacol Biochem Behav*. 12(6):937-41

Magnaghi, V., Cavarretta, I., Galbiati, M., Martini, L., Melcangi, R.C. (2001) Neuroactive steroids and peripheral myelin proteins. *Brain Res Brain Res Rev*. 37(1-3):360-71.

Majewska, M.D., Harrison, N.L., Schwartz, R.D., Barker, J.L., Paul, S.M. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 232:1004–1007.

Majewska, M.D., Mienville, J.M., Vicini, S. (1988) Neurosteroid pregnenolone sulfate antagonizes electrophysiological responses to GABA in neurons. *Neurosci Lett*. 90(3):279-84

Manzo, L., Gómez, M.J., Callejas-Aguilera, J.E., Donaire, R., Sabariego, M., Fernández-Teruel, A., Cañete, A., Blázquez, G., Papini, M.R., Torres, C. (2014) Relationship between EtOH preference and sensation/novelty seeking. *Physiol Behav*. 133:53-60

Marinelli, M., White, F.J. (2000) Enhanced vulnerability to cocaine self-administration is associated with elevated impulse activity of midbrain dopamine neurons. *J Neurosci*. 20(23):6676-85

Martin-Garcia, E., Pallares, M. (2005) Effects of intrahippocampal nicotine and neurosteroid administration on withdrawal in voluntary and chronic alcohol-drinking rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 29(9):1654-63

Martin-García, E., Darbra, S., Pallarès, M. (2007) Intrahippocampal allopregnanolone decreases voluntary chronic alcohol consumption in non-selected rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31(4):823-31

Martín-García, E., Darbra, S., Pallarés, M. (2008) Neonatal finasteride induces anxiogenic-like profile and deteriorates passive avoidance in adulthood after intrahippocampal neurosteroid administration. *Neuroscience*. 154(4):1497-505

Masur, J., Oliveira de Souza, M.L., Zwicker, A.P. (1986) The excitatory effects of ethanol: Absence in rats, no tolerance and increased sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 24:1125-8

Matsukawa, M., Nakadate, K., Ishihara, I., Okado, N. (2003) Synaptic loss following depletion of noradrenaline and/or serotonin in the rat visual cortex: a quantitative electron microscopic study. *Neuroscience* 122:627-35

Maurice, T., Junien, J.L., Privat, A. (1997) Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizocilpine-induced learning impairment in mice via σ_1 receptors. *Behav. Brain Res.* 83:159-64

Mayo, W., George, O., Darbra, S., Bouyer, J.J., Vallée, M., Darnaudéry, M., Pallarès, M., Lemaire-Mayo, V., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, N. (2003) Individual differences in cognitive aging: implication of pregnenolone sulfate. *Prog Neurobiol.* 71(1):43-8

McBride, W.J., Bodart, B., Lumeng, L., Li, T.K. (1995) Association between low contents of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens and high alcohol preference. *Alcohol Clin Exp Res.* 19(6):1420-2

McCarthy, M.M. (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev.* 88:91-124

McKinzie, R., Cox, R., Stewart, R.B., Dyr, W., Murphy, J.M., McBride, W.J., Lumeng, L., Li, T.K. (1998) Serotonin₃ receptor antagonism of alcohol intake: Effects of drinking conditions. *Alcohol.* 15(4):291-98

Melcangi, R. C., Poletti, A., Cavarretta, I., Celotti, F., Colciago, A., Magnaghi, V., Motta, M., Negri-Cesi, P., Martini, L. (1998) The 5 α -reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 65:295-299.

Melcangi, R.C., Giatti, S., Calabrese, D., Pesaresi, M., Cermenati, G., Mitro, N., Viviani, B., Garcia-Segura, L.M., Caruso, D. (2014) Levels and actions of progesterone and its metabolites in the nervous system during physiological and pathological conditions. *Prog. Neurobiol.* 113:56-69

Melchior, C.L., Ritzmann, R.F. (1994) Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav.* 48(4):893-7

Mellon, S.H., Griffin, L.D. (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab.* 13(1):35-43

Mellon, S.H. (2007) Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther.* 116(1):107-24

Meyer, P.J., Meshul, C.K., Phillips, T.J. (2009) Ethanol- and cocaine-induced locomotion are genetically related to increases in accumbal dopamine. *Genes Brain Behav.* 8(3):346-55

Mienville, J.M., Vicini, S. (1989) Pregnenolone sulfate antagonizes GABA_A receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res.* 489(1):190-4

Miller, W.L., Bose, H.S. (2011) Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res.* 52(12):2111-35

Miller, W.L. (2017) Steroidogenesis: Unanswered questions. *Trends Endocrinol Metab.* 28(11):771-793.

Minabe, Y., Ashby, C.R.Jr., Schwartz, J.E., Wang, R.Y. (1991) The 5-HT₃ receptor antagonists LY 277359 and granisetron potentiate the suppressant action of apomorphine on the basal firing rate of ventral tegmental dopamine cells. *Eur J Pharmacol.* 209:143-50

Modesti, P.A., Pela, I., Cecioni, I., Gensini, G.F., Serneri, G.G., Bartolozzi, G. (2006) Changes in blood pressure reactivity and 24-hour blood pressure profile occurring at puberty. *Angiology.* 45:443-50

Mòdol, L., Darbra, S., Vallée, M., Pallarès, M. (2013) Alteration of neonatal Allopregnanolone levels affects exploration, anxiety, aversive learning and adult behavioural response to intrahippocampal neurosteroids. *Behav Brain Res.* 241:96-104

Modol, L., Casas, C., Navarro, X., Llidó, A., Vallée, M., Pallarès, M., Darbra, S. (2014) Neonatal finasteride administration alters hippocampal $\alpha 4$ and δ GABAAR subunits expression and behavioural responses to progesterone in adult rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 17(2):259-73

Montagud-Romero, S., Daza-Losada, M., Vidal-Infer, A., Maldonado, C., Aguilar, M.A., Miñarro, J., Rodríguez-Arias, M. (2014) The novelty-seeking phenotype modulates the long-lasting effects of intermittent ethanol administration during adolescence, *PLoS One.* 9(3):92576

Monteleone, P., Luisi, S., Tonetti, A., Bernardi, F., Genazzani, A.D., Luisi, M., Petraglia, F., Genazzani, A.R. (2000) Allopregnanolone concentrations and premenstrual syndrome. *Eur J Endocrinol.* 142(3):269-73

Moore, C.F., Lycas, M.D., Bond, C.W. Johnson, B.A., Lynch, W.J. (2014) Acute and chronic administration of a low-dose combination of topiramate and ondansetron reduces ethanol's reinforcing effects in male alcohol preferring (P) rats. *Exp Clin Psychopharmacol.* 22(1):35-42

Moran, M.H., Smith, S.S. (1998) Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain Res.* 807:84-90

Morohaku, K., Pelton, S.H., Daugherty, D.J., Butler, W.R., Deng, W., Selvaraj, V. (2014) Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis. *Endocrinology.* 155:89-97

Morrow, A.L., VanDoren, M.J., Fleming, R., Penland, S. (2001) Ethanol and neurosteroid interactions in the brain. *Int Rev Neurobiol.* 46: 349-77

Mukai, Y., Higashin, T., Nagura, Y., Shimada, K. (2008) Studies on neurosteroids XXV Influence of a 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism. *Biol Pharm Bull.* 31(9):1646-50

- Muneoka, K., Kuwagata, M., Shirayama, Y., Ogawa, T., Shioda, S. (2009) Biphasic effects of neonatal allopregnanolone on striatal dopamine metabolism. *Neuroreport*. 20(9):860-3
- Muneoka, K., Kuwagata, M., Ogawa, T., Shioda, S. (2010) Sex-specific effects of early neonatal progesterone treatment on dopamine and serotonin metabolism in rat striatum and frontal cortex. *Life Sci*. 87(23-26):738-42
- Murphy, J.M., McBride, W.J., Lumeng, L., Li, T.K. (1982) Regional brain levels of monoamines in alcohol-preferring and -nonpreferring lines of rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 16:145-49
- Nentwig, T.B., Myers, K.P., Grisel, J.E. (2017) Initial subjective reward to alcohol in Sprague-Dawley rats. *Alcohol*. 58:19-22
- Netter, P., Hennig, J., Roed, I.S. (1996) Serotonin and dopamine as mediators of sensation seeking behavior. *Neuropsychobiology*. 34(3):155-65
- Oostland, M., Sellmeijer, J., van Hooft, J.A. (2011) Transient expression of functional 5-HT₃ receptors by glutamatergic granule cells in the early postnatal mouse cerebellum. *J Physiol*. 589:4837-46
- Oostland, M., Buijink, M.R., van Hooft, J.A. (2013) Serotonergic control of Purkinje cell maturation and climbing fibre elimination by 5-HT₃ receptors in the juvenile mouse cerebellum. *J Physiol*. 591:1793-807
- Oostland, M., van Hooft, J.A. (2013) The role of serotonin in cerebellar development. *Neuroscience*. 248:201-12
- Owens, D.F., Kriegstein, A.R. (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*. 3(9):715-27
- Pallarés, M., Darnaudéry, M., Day, J., Le Moal, M., Mayo, W. (1998) The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the nucleus basalis increases both acetylcholine release in the frontal cortex or amygdala and spatial memory. *Neuroscience*. 87(3):551-8
- Pallarès, M., Llidó, A., Mòdol, L., Vallée, M., Darbra, S. (2015) Finasteride administration potentiates the disruption of prepulse inhibition induced by forced swim stress. *Behav Brain Res*. 289:55-60
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapere, J.J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.R., Gavish, M. (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci*. 27:402–409
- Papadopoulos, V., Miller, W.L. (2012) Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 26(6):771-90

Parkitna, J.R., Sikora, M., Golda, S., Golembiowska, K., Bystrowska, B., Engblom, D., Bilbao, A., Przewlocki, R. (2013) Novelty-seeking behaviors and the escalation of alcohol drinking after abstinence in mice are controlled by metabotropic glutamate receptor 5 on neurons expressing Dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry*. 73(3):263-70

Paul, S.M., Purdy, R.H. (1992) Neuroactive steroids. *FASEB J*. 6(6):2311-22

Peacock, A., Leung, J., Larney, S., Colledge, S., Hickman, M., Rehm, J., Giovino, G.A., West, R., Hall, W., Griffiths, P., Ali, R., Gowing, L., Marsden, J., Ferrari, A.J., Grebely, J., Farrell, M., Degenhardt, L. (2018) Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*. 13(10):1905-26

Pei, Q., Zetterström, T., Leslie, R.A., Grahame-Smith, D.G. (1993) 5-HT₃ receptor antagonists inhibit morphine-induced stimulation of mesolimbic dopamine release and function in the rat. *Eur J Pharmacol*. 230(1):63-8

Pelletier, G. (2010) Steroidogenic enzymes in the brain: morphological aspects. *Prog Brain Res*. 181:193-207

Pfaar, H., von Holst, A., Vogt Weisenhorn, D.M., Brodski, C., Guimera, J., Wurst, W. (2002) mPet-1, a mouse ETS-domain transcription factor, is expressed in central serotonergic neurons. *Dev Genes Evol*. 212: 43-6

Phillips, T.J., Shen, E.H. (1996) Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *Int Rev Neurobiol*. 39:243-82.

Piazza, P.V., Deminiere, J.M., Le Moal, M., Simon, H. (1989). Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science*. 245:1511-13

Piazza, P.V., Rouge-Pont, F., Deminiere, J.M., Kharoubi, M., Le Moal, M., Simon, H. (1991) Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats pre-disposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res*. 567:169-74

Pietras, R.J., Szego, C.M. (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*. 265(5589):69-72.

Pisu, M.G., Garau, A., Boero, G., Biggio, F., Pibiri, V., Dore, R., Locci, V., Paci, E., Porcu, P., Serra, M. (2016) Sex differences in the outcome of juvenile social isolation on HPA axis function in rats. *Neuroscience*. 320:172-82

Pomata, P.E., Colman-Lerner, A.A., Barañao, J.L., Fiszman, M.L. (2000) In vivo evidences of early neurosteroid synthesis in the developing rat central nervous system and placenta. *Brain Res Dev Brain Res*. 120(1):83-6

Porcu, P., Barron, A.M., Frye, C.A., Walf, A.A., Yang, S.Y., He, X.Y., Morrow, A.L., Panzica, G.C., Melcangi, R.C. (2016) Neurosteroidogenesis today: Novel targets for neuroactive steroids synthesis and action and their relevance for translational research. *J Neuroendocrinol*. 28(2):12351

Porcu, P., Lallai, V., Locci, A., Catzeddu, S., Serra, V., Pisu, M.G., Serra, M., Dazzi, L., Concas, A. (2017) Changes in stress-stimulated allopregnanolone levels induced by neonatal estradiol treatment are associated with enhanced dopamine release in adult female rats: reversal by progesterone administration. *Psychopharmacology (Berl)*. 234(5):749-760

Powell, S.B., Paulus, M.P., Hartman, D.S., Godel, T., Geyer, M.A. (2003) RO-10-5824 is a selective dopamine D4 receptor agonist that increases novel object exploration in C57 mice. *Neuropsychopharmacology*. 44:473-81

Prini, P., Rusconi, F., Zamberletti, E., Gabaglio, M., Penna, F., Fasano, M., Battafoli, E., Parolaro, D., Rubino, T. (2018) Adolescent THC exposure in female rats leads to cognitive deficits through a mechanism involving chromatin modifications in the prefrontal cortex. *J Psychiatry Neurosci*. 2018 Mar;43(2):87-101

Purdy, R.H., Morrow, A.L., Moore, P.H. Jr., Paul, S.M. (1991) Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(10):4553-7

Rangel-Gomez, M., Meeter, M. (2016) Neurotransmitters and novelty: A systematic review. *J Psychopharmacol*. 30(1):3-12

Rapkin, A.J., Morgan, M., Goldman, L., Brann, D.W., Simone, D., Mahesh, V.B. (1997) Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstet Gynecol*. 90(5):709-14

Rasmussen, K., Stockton, M.E., Czachura, J.F. (1991) The 5-HT₃ receptor antagonist zatosetron decreases the number of spontaneously active A10 dopamine neurons. *Eur J Pharmacol*. 205:113-16

Ray, L.A., Mackillop, J., Monti, P.M. (2010) Subjective responses to alcohol consumption as endophenotypes: Advancing behavioral genetics in etiological and treatment models of alcoholism. *Subst Use Misuse*. 45:1742-65

Reddy, D.S., Kulkarni, S.K. (1998) Proconvulsant effects of neurosteroids pregnenolone sulfate and dehydroepiandrosteronesulfate in mice. *Eur J Pharmacol*. 345(1):55-9

Reddy, D.S. (2003) Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol*. 15(3-4):197-234

Richter, C.P., Campbell, K.H. (1940) Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science*. 91:507-8

Rodd, Z.A., Melendez, R.I., Bell, R.L., Kuc, K.A., Zhang, Y., Murphy, J.M., McBride, W.J. (2004) Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male Wistar rats: evidence for involvement of dopamine neurons. *J Neurosci*. 24(5):1050-7

- Romeo, R.D. (2017) The impact of stress on the structure of the adolescent brain: Implications for adolescent mental health. *Brain Res.* 1654(Pt B):185-91
- Romijn, H.J., Hofman, M.A., Gramsbergen, A. (1991) At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev.* 26(1):61-7
- Rone, M.B., Fan, J., Papadopoulos, V. (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta.* 1791(7):646-58
- Rosenberg, C.M. (1968) Young drug addicts: addiction and its consequences. *Med J Aust.* 1(24):1031-3
- Rosenfeld, P., Suchecki, D., Levine, S. (1992) Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev.* 16(4):553-68
- Rupprecht, R., Reul, J.M., Trapp, T., van Steensel, B., Wetzel, C., Damm, K., Ziegglänsberger, W., Holsboer, F. (1993) Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron.* 11(3):523-30
- Rupprecht, R., Holsboer, F. (1999) Neuroactive steroids: Mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 22(9):410-6
- Rupprecht, R. (2003) Neuroactive steroids: Mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology.* 28(2):139-68
- Sachs, B.D., Salahi, A.A., Caron, M.G. (2014) Congenital brain serotonin deficiency leads to reduced ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice. *Neuropharmacology.* 77:177-84
- Safranski, T.J., Lamberson, W.R., Keisler, D.H. (1993) Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol Reprod.* 48:669-73
- Salamone, J.D. (2007) Functions of mesolimbic dopamine: changing concepts and shifting paradigms. *Psychopharmacology (Berl).* 191:389
- Sapolsky, R.M., Meaney, M.J. (1986) Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 396(1):64-76
- Sari, Y., Johnson, V.R., Weedman, J.M. (2011) Role of the serotonergic system in alcohol dependence: from animal models to clinics. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 98:401-43
- Schmidt, M.V. (2011) Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology.* 36(3):330-8

Schuckit, M.A. (1994) Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *Am J Psychiatry*. 151(2):184-9

Schumacher, M., Mattern, C., Ghoumari, A., Oudinet, J.P., Liere, P., Labombarda, F., Sitruk-Ware, R., De Nicola, A.F., Guennoun, R. (2014) Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog Neurobiol*. 113:6-39

Serra, M., Pisu, M.G., Littera, M., Papi, G., Sanna, E., Tuveri, F., Usala, L., Purdy, R.H., Biggio, G. (2000) Social isolation-induced decreases in both the abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *J Neurochem*. 75(2):732-40

Shen, H., Gong, Q.H., Aoki, C., Yuan, M., Ruderman, Y., Dattilo, M., Williams, K., Smith, S.S. (2007) Reversal of neurosteroid effects at alpha4-beta2-delta GABA-A receptors triggers anxiety at puberty. *Nat Neurosci*. 10:469-77

Silvers, J.M., Tokunaga, S., Berry, R.B., White, A.M., Matthews, D.B. (2003) Impairments in spatial learning and memory: ethanol, allopregnanolone, and the hippocampus. *Brain Res Brain Res Rev*. 43:275-84

Simoncini, T., Genazzani, A.R. (2003) Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*. 148(3):281-92

Sipilä, S.T., Huttu, K., Voipio, J., Kaila, K. (2006) Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na⁺ current and terminated by a slow Ca²⁺-activated K⁺ current. *Eur J Neurosci*. 23(9):2330-8

Smith, C.C., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (2014) Pregnenolone sulfate as a modulator of synaptic plasticity. *Psychopharmacology (Berl)*. 231(17):3537-56

Smith, S.S. (2002). Withdrawal properties of a neuroactive steroid: implication for GABAA receptor gene regulation in the brain and anxiety behavior. *Steroids*. 67: 519-28

Smith, S.S., Shen, H., Gong, Q.H., Zhou, X. (2007) Neurosteroid regulation of GABA(A) receptors: Focus on the alpha4 and delta subunits. *Pharmacol Ther*. 116(1):58-76

Smith, S.S., Aoki, C., Shen, H. (2009) Puberty, steroids and GABA(A) receptor plasticity. *Psychoneuroendocrinology*. 34S1:S91-S103

Smith, S.S. (2013) $\alpha 4\beta\delta$ GABAA receptors and tonic inhibitory current during adolescence: effects on mood and synaptic plasticity. *Front Neural Circuits*. 7:135

Söderpalm, A.H., Hansen, S. (1999) Alcohol alliesthesia: food restriction increases the palatability of alcohol through a corticosterone-dependent mechanism. *Physiol Behav*. 67(3):409-15

Söderpalm, B., Ericson, M. (2013) Neurocircuitry involved in the development of alcohol addiction: the dopamine system and its access points. *Curr Top Behav Neurosci.* 13:127-61

Spear, L.P. (2015) Adolescent alcohol exposure: are there separable vulnerable periods within adolescence? *Physiol Behav.* 148:122-30

Stamatakis, A., Pondiki, S., Kitraki, E., Diamantopoulou, A., Panagiotaropoulos, T., Raftogianni, A., Stylianopoulou, F. (2008) Effect of neonatal handling on adult rat spatial learning and memory following acute stress. *Stress.* 11(2):148-59

Steckelbroeck, S., Watzka, M., Stoffel-Wagner, B., Hans, V.H., Redel, L., Clusmann, H., Elger, C.E., Bidlingmaier, F., Klingmüller, D. (2001). Expression of the 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 mRNA in the human brain. *Mol Cell Endocrinol.* 171:165-68

Stewart, J. (2008) Psychological and neural mechanisms of relapse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363:3147-58

Stocco, D.M., Zhao, A.H., Tu, L.N., Morohaku, K., Selvaraj, V. (2017) A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 441:7-16

Susman, E.J., Nottelmann, E.D., Dorn, L.D., Inoff-Germain, G., Chrousos, G.P. (1988) Physiological and behavioral aspects of stress in adolescence. *Adv Exp Med Biol.* 245:341-52

Swerdlow, N.R., Geyer, M.A., Braff, D.L. (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 156:194-215

Tanaka, D.H., Nakajima, K. (2012) Migratory pathways of GABAergic interneurons when they enter the neocortex. *Eur J Neurosci.* 35:1655-60

Todeschin, A.S., Winkelmann-Duarte, E.C., Jacob, M.H., Aranda, B.C., Jacobs, S., Fernandes, M.C., Ribeiro, M.F., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B. (2009) Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav.* 56(1):93-100

Trifilieff, P., Martinez, D. (2014) Imaging addiction: D2 receptors and dopamine signaling in the striatum as biomarkers for impulsivity. *Neuropharmacology.* 76 Pt B:498-509

Tomkins, D.M., Le, A.D., Sellers, E.M. (1995) Effect of the 5-HT3 antagonist ondansetron on voluntary ethanol intake in rats and mice maintained on a limited access procedure. *Psychopharmacology.* 117(4):479-485

Torres, J. M., Ortega, E. (2003a) Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J.* 17:1428-33

Torres, J. M., Ortega, E. (2003b) Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in female adolescent humans, *Neuropsychopharmacology.* 28(6): 1207-9

Torres, J. M., Ortega, E. (2004) Alcohol intoxication increases allopregnanolone levels in male adolescent humans, *Psychopharmacology.* 172(3):352-55

Tournier, B.B., Steimer, T., Millet, P., Moulin-Sallanon, M., Vallet, P., Ibañez, V., Ginovart, N. (2013) Innately low D2 receptor availability is associated with high novelty-seeking and enhanced behavioural sensitization to amphetamine. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16(8):1819-34

Towle, A.C., Sze, P.Y. (1983) Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem.* 18:135-143.

Tu, L.N., Morohaku, K., Manna, P.R., Pelton, S.H., Butler, W.R., Stocco, D.M., Selvaraj, V. (2014) Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis. *J Biol Chem.* 289(40):27444-54

Tuem, K.B., Atey, T.M. (2017) Neuroactive steroids: Receptor interactions and responses. *Front Neurol.* 8:442

Treit, D., Fundytus, M. (1988) Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 31(4):959-62.

Tzschentke, T.M., Schmidt, W.J. (2000) Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol.* 14:131-42

Vallée, M., Mayo, W., Darnaudéry, M., Corpéchet, C., Young, J., Koehl, M., Le Moal, M., Baulieu, E.E., Robel, P., Simon, H. (1997) Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolonesulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(26):14865-70

Vallée, M., Vitiello, S., Bellocchio, L., Hébert-Chatelain, E., Monlezun, S., Martin-Garcia, E., Kasanetz, F., Baillie, G.L., Panin, F., Cathala, A., Roullot-Lacarrière, V., Fabre, S., Hurst, D.P., Lynch, D.L., Shore, D.M., Deroche-Gamonet, V., Spampinato, U., Revest, J.M., Maldonado, R., Reggio, P.H., Ross, R.A., Marsicano, G., Piazza, P.V. (2014) Pregnenolone can protect the brain from cannabis intoxication. *Science.* 343(6166):94-8

Valera, S., Ballivet, M., Bertrand, D. (1992) Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9949-53

VanDoren, M.J., Matthews, D.B., Janis, G.C., Grobin, A.C., Devaud, L.L., Morrow, A.L. (2000) Neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one modulates electrophysiological and behavioral actions of EtOH, *J Neurosci.* 20:1982-9

Viero, C., Dayanithi, G. (2008) Neurosteroids are excitatory in supraoptic neurons but inhibitory in the peripheral nervous system: it is all about oxytocin and progesterone receptors. *Prog Brain Res.* 170:177-92

Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, J., Parnavelas, J.G. (2007) Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur.J.Neurosci.* 26: 331-44

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Hitzemann, R., Ding, Y.S., Pappas, N., Shea, C., Piscani, K. (1996) Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res.* 20(9):1594-8

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Gatley, S.J., Gifford, A., Hitzemann, R., Ding, Y.S., Pappas, N. (1999) Prediction of reinforcing responses to psychostimulants in humans by brain dopamine D2 receptor levels. *Am J Psychiatry.* 156(9):1440-3

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Tomasi, D. (2012) Addiction circuitry in the human brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 52:321-36

Vucurovic, K., Gallopin, T., Ferezou, I., Rancillac, A., Chameau, P., van Hooft, J.A., Geoffroy, H., Monyer, H., Rossier, J., Vitalis, T. (2010) Serotonin 3A receptor subtype as an early and protracted marker of cortical interneuron subpopulations. *Cereb Cortex.* 20:2333-47

Waterhouse, R.N., Chang, R.C., Atuehene, N., Collier, T.L. (2007) In vitro and in vivo binding of neuroactive steroids to the sigma-1 receptor as measured with the positron emission tomography radioligand [18 F]FPS. *Synapse.* 61(7):540-6

Weir, C.J., Ling, A.T., Belelli, D., Wildsmith, J.A., Peters, J.A., Lambert, J.J. (2004) The interaction of anaesthetic steroids with recombinant glycine and GABA_A receptors. *Br J Anaesth.* 92(5):704-11

Wetzel, C.H., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglgänsberger, W., Holsboer, F., Rupprecht, R. (1998) Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Mol Endocrinol.* 12(9):1441-51

Williamson, J., Mtchedlishvili, Z., Kapur, J. (2004) Characterization of the convulsant action of pregnenolone sulfate. *Neuropharmacology.* 46(6):856-64

Willuhn, I., Wanat, M.J., Clark, J.J., Phillips, P.E. (2010) Dopamine signaling in the nucleus accumbens of animals self-administering drugs of abuse. *Curr Top Behav Neurosci.* 3:29-71

Willuhn, I., Burgeno, L.M., Groblewski P.A., Phillips, P. E., (2014) Excessive cocaine use results from decreased phasic dopamine signaling in the striatum. *Nat Neurosci.* 17(5):704-9

Wise, R.A., Bozarth, M.A. (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev.* 94(4):469-92

Woods, J.E., McKay, P.F., Masters, J., Seyoum, R., Chen, A., La Duff, L., Lewis, M.J., June, H.L. (2003) Differential responding for brain stimulation reward and sucrose in high-alcohol-drinking (HAD) and low-alcohol-drinking (LAD) rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 27:926-36

World Health Organization (WHO). Global Information System on Alcohol and Health (GISAH). Geneva: WHO; 2016

Wu, F.S., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1990) Inverse modulation of gamma-aminobutyric acid- and glycine-induced currents by progesterone. *Mol Pharmacol.* 37(5):597-602

Weaver, C.E. Jr., Park-Chung, M., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1997) 17beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.* 761(2):338-41

Weaver, C.E. Jr., Wu, F.S., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1998) Pregnenolone sulfate exacerbates NMDA-induced death of hippocampal neurons. *Brain Res.* 803(1-2):129-36

Yaakob, N., Malone, D.T., Exintaris, B., Irving, H.R. (2011) Heterogeneity amongst 5HT3 receptor subunits: is this significant? *Curr Mol Med.* 1:57-68

Yaghoubi, N., Malayev, A., Russek, S.J., Gibbs, T.T., Farb, D.H. (1998) Neurosteroid modulation of recombinant ionotropic glutamate receptors. *Brain Res.* 803(1-2):153-60

Yamamoto, T., Shimizu, H. (1985) Formation of a persistent inhibitory state of brain adenylate cyclase by GTP analog: Regional differences. *Neurochem Int.* 7(2):357-61

Yan, Q.S., Zheng, S.Z., Yan, S.E. (2004) Involvement of 5-HT1B receptors within the ventral tegmental area in regulation of mesolimbic dopaminergic neuronal activity via GABA mechanisms: a study with dual-probe microdialysis. *Brain Res.* 1021:82-91

Yardley, M.M., Ray, L.A. (2017) Medications development for the treatment of alcohol use disorder: insights into the predictive value of animal and human laboratory models. *Addict Biol.* 22(3):581-615

Yoon, S.Y., Roh, D.H., Seo, H.S., Kang, S.Y., Han, H.J., Beitz, A.J., Lee, J.H. (2009) Intrathecal injection of the neurosteroid, DHEAS, produces mechanical allodynia in mice: involvement of spinal sigma-1 and GABA receptors. *Br J Pharmacol.* 157(4):666-73

Zhang, W.N., Bast, T., Feldon, J. (2002) Prepulse inhibition in rats with temporary inhibition/inactivation of ventral or dorsal hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav.* 73(4):929-40.

Zhou, F.C., Zhang, J.K., Lumeng, L., Li, T.K. (1995) Mesolimbic dopamine system in alcohol-preferring rats. *Alcohol.* 12(5):403-12

Zimmerberg, B., Kajunski, E.W. (2004) Sexually dimorphic effects of postnatal allopregnanolone on the development of anxiety behavior after early deprivation, *Pharmacol Biochem Behav.* 78(3):465-71.

Zou, L.B., Yamada, K., Sasa, M., Nakata, Y., Nabeshima, T. (2000) Effects of sigma(1) receptor agonist SA4503 and neuroactive steroids on performance in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology.* 39(9):1617-27

Zuckerman, M. (1974) The sensation seeking motive. *Prog Exp Pers Res.* 7:79-148

ANEXO

Póster: Neonatal allopregnanolone manipulation affects sensitivity to stimulating effects of alcohol in adulthood: possible role in drug abuse vulnerability

NEONATAL ALLOPREGNANOLONE MANIPULATION AFFECTS SENSITIVITY TO STIMULATING EFFECTS OF ALCOHOL IN ADULTHOOD: POSSIBLE ROLE IN DRUG ABUSE VULNERABILITY

Iris Bartolomé, Anna Llidó, Sònia Darbra and Marc Pallarès

Group of Neurosteroids and Behaviour, Departament de Psicologia i Metodologia de les Ciències de la Salut, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain



INTRODUCTION

Neurosteroids (NS) are a subtype of steroids that can be synthesized de novo in the CNS (1), and act as modulators of ionotropic receptors for neurotransmitters (2). In recent studies it has shown that NS are critical to a successful development of the nervous system and therefore an incorrect maturation affects behavior.

Our group has focused on how one of these NS (Allopregnanolone) affects development. We have found that increasing AlloP neonatal causes an increase locomotor activity in new environments (3) and reduces anxiety in anxiety test in adulthood (4). This kind of behaviors have been related with a sensation seeking pattern (5) and the sensation seeking and novelty seeking have been related with drug use and abuse (6). In the present experiment we have studied the effects of neonatal AlloP levels alteration and progesterone administration in adolescence on the sensitivity to the alcohol stimulant effects in adulthood.

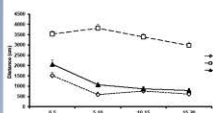
We have chosen the sensitivity to the motor stimulant effects of low ethanol doses because it's well known there is a wide range of addictive substances, including alcohol, which have the capacity to produce psychomotor activation acting to a common biological mechanism that has as one of its components dopaminergic fibres projecting from the midbrain to limbic and cortical regions (7). In fact, it has been found that sensitization to the stimulant effects of alcohol increases self-administration and its rewarding properties (8).

Experimental design

EXPERIMENT 1		Early Adolescent PN30	Adulthood PN70	
Neonatal treatment: (PNS-PNS)	No Handled	Vehicle	Ethanol 0g/kg	Behavioral test: Sensitivity to alcohol-induced locomotor stimulation in adulthood on Open Field
		Progesterone (25mg/kg)	Ethanol 0.5g/kg	
			Ethanol 0.8g/kg	
EXPERIMENT 2		Early Adolescent PN30	Adulthood PN70	
Neonatal treatment: (PNS-PNS)	Allopregnanolone (AlloP) (20mg/kg)	Vehicle	Ethanol 0g/kg	Behavioral test: Sensitivity to alcohol-induced locomotor stimulation in adulthood
		Progesterone (25mg/kg)	Ethanol 0.5g/kg	
	Finasteride (FIN) (50mg/kg)	Vehicle	Ethanol 0g/kg	Open Field test
		Progesterone (25mg/kg)	Ethanol 0.5g/kg	
	Vehicle (VEH)	Vehicle	Ethanol 0g/kg	Open Field test
		Progesterone (25mg/kg)	Ethanol 0.5g/kg	
No Handled (NH)	Vehicle	Ethanol 0g/kg	Open Field test	
	Progesterone (25mg/kg)	Ethanol 0.5g/kg		

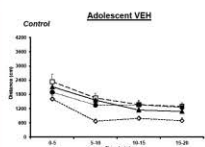
RESULTS

Locomotor Response to Alcohol Doses

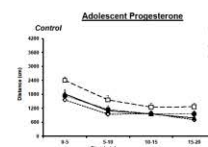


GLOBAL $F(2,27)=77.15; p<0.001$
Alcohol 0.5 < Control, Alcohol 0.8 ($p<0.001$)

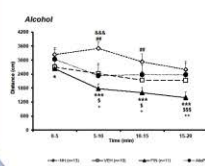
Sensitivity to Locomotor Stimulant Effects of Alcohol



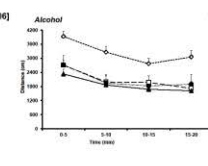
GLOBAL $F(3,41)=5.13; p<0.01$
NH < FIN, AlloP ($p<0.01$)
NH < VEH ($p<0.001$)



GLOBAL $F(3,37)=4.54; p<0.01$
VEH > NH ($p<0.01$)
VEH > FIN, AlloP ($p<0.01$)



Interaction effect $F(9,117)=1.86; p=0.06$
FIN < NH (*)
FIN < VEH (+)
FIN < AlloP (+)
AlloP < NH (8)
VEH < NH (8)



GLOBAL $F(3,45)=9.77; p<0.001$
NH < VEH, FIN, AlloP ($p<0.001$)

CONCLUSIONS

- Acute administration of 0.5 g/kg (low dose) of alcohol have locomotor stimulating effects.
- Neonatal manipulation (vehicle injections) increased basal locomotor activity (in adult control group) in the Open Field, but this effect changed when Progesterone were injected in adolescence, which seems to be effective to modify the neonatal manipulation effect related to s.c. injections.
- Neonatal administration of finasteride reduced sensitivity to locomotor stimulating effects of low doses of alcohol (0.5 g/kg) in adulthood, and this effect was not seen in animals injected with progesterone in adolescence.

GENERAL CONCLUSION

Neonatal AlloP alterations affect the sensitivity to locomotor stimulant effects of low alcohol dose and this effect can be modified by the administration of progesterone in adolescence, suggesting a possible role of neonatal and adolescent neurosteroids in the vulnerability to alcohol abuse.

REFERENCES

- Balleu E (1981). Steroid hormone receptors. *Expos Annu Biochim Med* 34: 1-25.
- Majewska MG, Harrison NI, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232:1004-7.
- Darbra S, Pallarès M (2009). Neonatal allopregnanolone increases novelty-directed locomotion and disrupts behavioural responses to GABA receptor modulators in adulthood. *Int J Dev Neurosci* 27: 637-645.
- Darbra S, Pallarès M (2012). Effects of early postnatal allopregnanolone administration on elevated plus maze anxiety scores in adult male Wistar rats. *Neuropsychobiology* 65(1): 20-27.
- Laviola G, Maci S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 19-31.
- Bolin D, Derechin E (2012). Responses to novelty and vulnerability to ethanol addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3(11): 4834-4842.
- Wise RA (1987). The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol Ther* 35(1-2): 227-263.
- Abraham PP, Ariwodola OJ, Butler TB, Rau AR, Skelly M, Carter E, Alexander NP, McCool BA, Souza-Fernandes ML, Weiner J (2013). Locomotor sensitization to ethanol impairs NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in the nucleus accumbens and increases ethanol self-administration. *J Neurosci* 33(11): 4834-4842.

Proyectos financiados por: Ministerio de Economía y Competitividad PS 2012-36646

Póster: Neonatal neurosteroids levels alteration on alcohol abuse vulnerability: participation of serotonin 5-HT3 receptors

Neonatal neurosteroids levels alteration on alcohol abuse vulnerability: participation of serotonin 5HT3 receptors

Iris Bartolomé, Anna Llidó, Sònia Darbra and Marc Pallarès

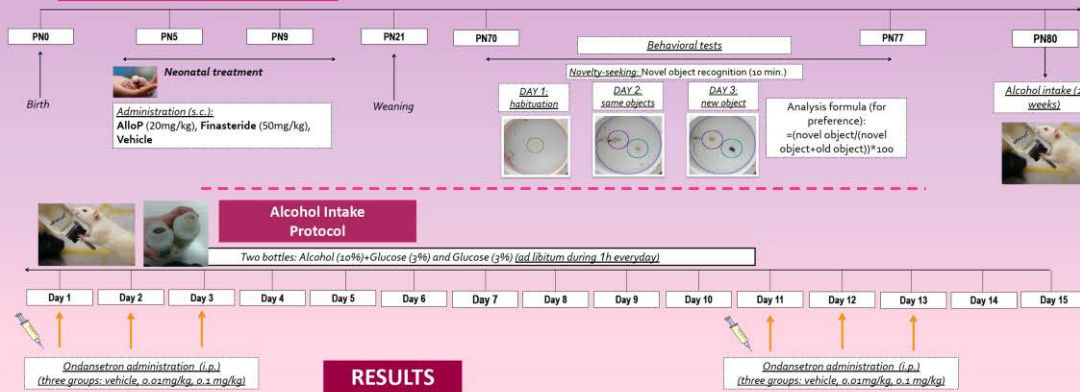
Group of Neurosteroids and Behaviour, Departament de Psicobiologia i Metodologia de les Ciències de la Salut, Institut de Neurociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

INTRODUCTION

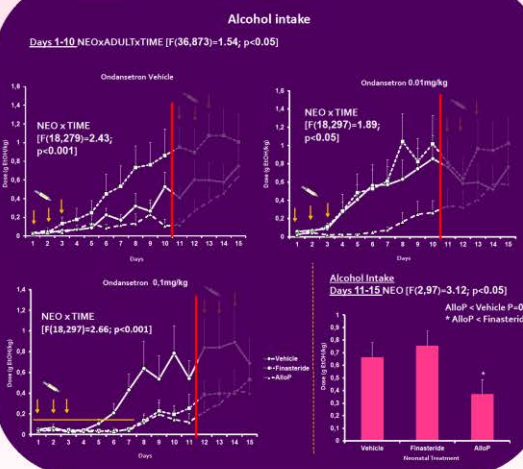
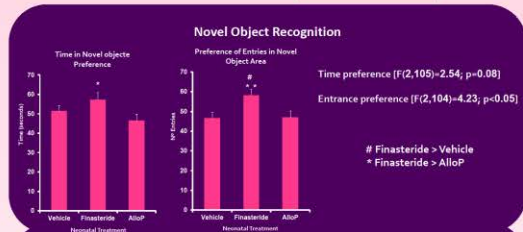
Neurosteroids are a subtype of steroids that can be synthesized de novo in the Central Nervous System (1), and act as modulators of ionotropic receptors for neurotransmitters (2). In recent studies it has shown that neurosteroids are critical to a successful development of the nervous system and therefore an incorrect maturation affect behavior.

Our group has focused on how one of these neurosteroids (Allopregnanolone (AlloP)) affects development. We have found that increasing AlloP neonatal causes an increase locomotor activity in new environments (3) and reduces anxiety in adulthood (4). This kind of behaviors have been related with a sensation/novelty-seeking pattern (5) and the sensation-seeking and novelty-seeking have been related with drug use and abuse (6). We have recently reported that the neonatal administration of finasteride (an AlloP synthesis inhibitor (7)), alters the ethanol intake and decreases ventrostriatal serotonin levels in adulthood (8). In the present experiment we have studied the effects of neonatal AlloP levels alteration on the novelty-seeking pattern and alcohol intake in adulthood. In order to test a possible role of serotonin systems, we have tested whether the effects of a 5-HT3 serotonin receptor antagonist (ondansetron) on alcohol intake is affected by neonatal AlloP levels alteration.

MATERIAL&METHODS



RESULTS



CONCLUSIONS

- Neonatal AlloP levels manipulation through finasteride increased the preference for the new object in the "novelty-seeking" test and also increased alcohol intake.
 - Ondansetron reduced alcohol intake only in animals that received neonatal finasteride.
- GENERAL CONCLUSION**
- Manipulation of neurosteroids such as AlloP in crucial stages of development seems to play an important role in the vulnerability of drug abuse.
 - The effects of ondansetron (5-HT3 antagonist) on alcohol are different depending on the manipulation of neonatal AlloP, suggesting a possible alteration of 5-HT3 receptors.

REFERENCES

1. Basilev EE (2001). Steroid hormone receptors. *Expans Annu Biochim Med* 34: 1-25
2. Malenka MD, Harrison HL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232: 1004-7
3. Darbra S, Pallarès M (2009). Neonatal allopregnanolone increases novelty-directed locomotion and disrupts behavioural responses to GABA_A receptor modulators in adulthood. *Int J Dev Neurosci* 27: 617-625
4. Darbra S, Pallarès M (2012). Effects of early postnatal allopregnanolone administration on elevated plus maze anxiety scores in adult male Wistar rats. *Neuropsychobiology* 65(1): 20-27
5. Lavikla G, Mairi S, Morley-Fletcher S, Adisani W (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychological determinants and early epigenetic influence. *Neuropsych Behav Rev* 27: 19-31
6. Belli D, Dinicola-Castano V (2012). Responses to novelty and vulnerability to cocaine addiction: contribution of a multi-symptomatic animal model. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(11)
7. Anzures B, Elsworth R, Anderson S, Geisler W, Bull HC, Harris CS (1997). Inhibition of rat alpha-reductase by finasteride: evidence for isozyme differences in the mechanism of inhibition. *J Steroid Biochem Med Biol* 61: 55-64
8. Ildó A, Bartolomé I, Darbra S, Pallarès M (2015). Effects of neonatal allopregnanolone manipulations and early maternal separation on adult alcohol intake and monoamine levels in ventral striatum of male rats. *Horm Behav* 82: 11-20.

email: iris.bartolomeirre@gmail.com



Proyectos financiados por: Ministerio de Economía y Competitividad PGC2013-2016

