



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE

LABORATORIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGÍA

Cuantificación de la expresión del RNAm de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa en un modelo de ansiedad en ratas hembra Wistar y Wistar Kyoto

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

**BANDA MARTÍNEZ ITZEL OLIVIA**

**Director de Tesis: Dra. Erika Estrada Camarena**

**Asesor interno: Dra. Leticia Morales Ledesma**



México, D.F.

Octubre, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Inténtalo, ponle lo mejor de ti mismo y siempre conseguirás muchísimo, te enriquecerá aunque sólo sea convencerte de que no era posible, pero eso tan sólo ya vale la pena y justifica haber emprendido ese camino.*

**Vale más saber alguna cosa de todo, que saberlo todo de una sola cosa.**

Blaise Pascal

*Si las cosas que realmente valen la pena fueran fáciles, cualquiera las haría.*

Pablo Hernández

**Por la calle del ya voy, se va a la casa del nunca.**

Cervantes

*Para lograr lo posible, hay que intentar lo imposible.*

Herman Hesse

**Solo hay una cosa que hace que un sueño sea imposible de hacer y es el miedo al fracaso.**

Paulo Coelho

*Los jóvenes no saben suficiente como para ser prudentes y por ello intentan lo imposible... y lo consiguen generación tras generación.*

Pearl S Buck

**Siempre, todo parece imposible, hasta que se hace**

Nelson Mandela.

*Cuanto más se eleva un hombre, más pequeño les parece a los que no saben volar.*

Nietzsche

Creo que los emprendedores cuando se enfrentan inicialmente a su idea, muchas veces se preguntan **¿Y si es imposible?** unas veces por las dificultades que prevén y otras veces porque va contra lo establecido, contra las verdades científicas y sociales, contra lo que le dicen los demás, pero sobre todo las dudas son con ellos mismos, porque a veces les parece absurda la lucha, demasiado sacrificio apartar todas las piedras del camino y es en esos momento donde necesitan alrededor gente positiva que ve las cosas con color y no gente negativa que ve todo en blanco y negro, lo que menos necesitan en esos momentos de duda es gente tóxica a su alrededor, necesitan gente que les apoye, que les motive a intentarlo, a ensayar, a experimentar, a estar en beta permanente, a hacer realidad sus ideas, sus sueños con pasión.

## ¿Biología?

Como todo niño soñaba con estudiar muchas cosas, quería estudiar veterinaria, después derecho, diseño, química, y por fin, biología. En la prepa conocí a la gran ciencia, tenía un profesor que me apasionaban sus clases, siempre puntual a ellas y por supuesto casi siempre participaba, me gustaba saber todo del todo, pero no terminaba de conocer, porque realmente la biología es una ciencia inmensa y aún falta mucho más por descubrir. Había muchas dudas que seguían surgiendo y quería saber más, sin embargo se acababa la prepa, ya no iba a ver más clase de biología, así que decidí estudiar **biología**.

*Realmente siendo biólogo, ves el mundo diferente, lo ves con otros ojos*

Cuando ves a un perro con la lengua fuera, sabes que es su forma de sudar porque no tiene glándulas sudoríparas. Cuando te haces una herida, te imaginas las plaquetas amontonándose para cerrarla. Cuando riegas una planta, sabes cómo el agua llegará a las hojas sólo por capilaridad. Cuando te notas el pulso, ves las válvulas del corazón moviéndose rítmicamente., cuando estas enamorado, sabes que esta pasando en realidad y cada que te vemos nos queda claro que eres un animal, igual que nosotros.

*La biología es la carrera más bonita del mundo, no dudo que la química u otras mas no lo sean, pero la biología rebasa lo maravilloso, hoy ya puedo decir que si estoy enamorada de la biología y que me encanta compartir lo magnifico que es el ser vivo y no vivo. Sin duda volvería a estudiar biología en mi casa, Fes-Z.*

## Ahora sabemos que...

Un Biólogo no huele, olfatea.

Un Biólogo no respira, rompe carbohidratos.

Un Biólogo no se deprime, sufre disfunción del hipotálamo.

Un Biólogo no admira la naturaleza, analiza el ecosistema.

Un Biólogo no hace elogios, describe procesos.

Un Biólogo no tiene reflejos, tiene un mensaje de neurotransmisión involuntaria. .

Un Biólogo no tiene pareja, tiene complemento génico.

Un Biólogo no admite errores, argumenta que sus actos dependen de caracteres hereditarios sumados a aprendizaje adquirido en la infancia.

Un Biólogo no habla, coordina vibraciones de las cuerdas vocales.

Un Biólogo no piensa, realiza sinapsis.

Un Biólogo no se asusta, recibe una respuesta galvánica incoherente.

Un Biólogo no se emociona, tiene picos de niveles de adrenalina.

Un Biólogo macho no compite, reafirma sus niveles de testosterona.

Un Biólogo hembra no es sensible, tiene ciclos hormonales periódicos.

Un Biólogo no se enamora, sufre reacciones químicas y psicosomáticas.

Un Biólogo no pierde energía, gasta ATP.

Un Biólogo no hace cambios, procesa evoluciones.

Un Biólogo no fallece, sufre muerte histológica.

Un Biólogo no se desprende del espíritu, transforma su energía.

Un Biólogo no deja hijos, alcanza éxito reproductivo

.

Una Bióloga no presenta ansiedad, solo quizá la  $P_4$  no se esté metabolizando a ALLO porque la 5a-R está haciendo de las suyas.

## DEDICATORIAS

A toda mi **familia** , por su comprensión, amor, confianza, apoyo y por cada lección que me enseñaron. Gracias.

A mis **abuelos** que aunque hoy ya no me acompañan, les dedico todos mis logros, esfuerzos y amor. Donde quieran que estén le debo mucho por todo lo que me brindaron y por ser parte de mi corazón y formación como persona. Gracias.

A mi **Madre Delia M. V.**, por su confianza, apoyo incondicional, por el amor que me brinda, por su ocupación, desvelo y por cada sacrificio que realizó para poder continuar mis estudios y realizar mis sueños, por enseñarme que nada es imposible y seguir adelante, Este logro es para ti y por ti. Por todo esto y más. Gracias.

A mi **Padre Antonio B. G.**, por su comprensión, paciencia, confianza y vivencias que me han ayudado a formarme como persona.  
Gracias.

A mi **Hermana Diana B. M.**, por creer en mí, por soñar junto conmigo, por sus enseñanzas, su compañía, apoyo, comprensión y por alentarme a hacer realidad mis sueños.

Por ser parte de mí, por tu amor, paciencia, compañía, apoyo durante este proyecto, por creer en mí y por estar conmigo en esta etapa de mi vida tan importante en que cumplo una meta más. Gracias **Julio R. S.** 

A cada una de mis **amistades** que fueron parte de mi formación académica desde mis inicios y hasta hoy en día, por su confianza, amistad y lealtad y por cada momento que compartieron y vivieron conmigo, por creer en mí y recordarme que, ¡Si se puede!.  
Gracias

A mis profesores, porque cada una de sus enseñanzas, conocimientos y aportaciones por sus orientaciones, por brindarme la mejor formación académica, apoyo, amistad, por creer en mí y por presentarme a la Biología. Gracias.

♡ Hoy por fin, soy Lic. En Biología. ♡  
Y realmente me hace muy feliz, es como soñar despierta.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Zaragoza** por abrirme las puertas y darme la oportunidad de realizar mis sueños. Por ser parte de mi formación académica. Gracias.

Al **Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente**, por permitirme realizar este trabajo bajo sus instalaciones.

A la **Dra. Erika M. Estrada Camarena** por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio, por su apoyo, asesorías y enseñanzas que ayudaron a mi formación teórica, práctica. Gracias.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma** por su tiempo, asesoría y apoyo en la realización de este trabajo. Gracias.

A la **Dra. Nelly M. Vega Rivera** por sus asesorías, enseñanzas y habilidades compartidas que ayudaron a mi formación teórica, práctica, personal, por el apoyo en el manejo del paquete Sigma Plot y por su apoyo en la técnica de ELISA. Gracias

A la **Dra. Patricia de Gortari**, a **Isabel Amaya** por su apoyo y conocimiento brindado en la técnica de PCR.

A **Dannia M Islas Preciado** por su asesoría en la elaboración de este proyecto y apoyo en la técnica ELISA.

Al **CINVESTAV sur**; a la **Dra. Carolina López Ruvalcaba, Isabel Beltrán** por brindarme los animales de la cepa WKY utilizadas en este proyecto.

A **mis sinodales** por sus observaciones, las cuáles lograron enriquecer este trabajo.

▶ **María Elena Ayala Escobar**

▶ **Eva Aguirre Hernández**

▶ **Lucila Álvarez Barrera**

A cada uno de mis **compañeros de laboratorio**, por sus aportaciones a este trabajo. Gracias.

A la **Secretaría de Salud Pública** por brindarme el apoyo con la beca PROBEL.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

- 3 $\alpha$ -HSD:** 3 alfa- hidroxisteroide deshidrogenasa
- 3 $\beta$ -HSD:** 3 beta- hidroxisteroide deshidrogenasa
- 5 $\alpha$ - R:** 5 alfa- Reductasa
- 5 $\alpha$ - R1:** 5 alfa- Reductasa tipo 1
- 5 $\alpha$ - R2:** 5 alfa- Reductasa tipo 2
- ACTH:** Hormona adrenocorticotropa
- AGPC:** Ácido Guanidina fenol cloroformo
- ALLO:** Alopregnanolona
- ANOVA:** Análisis de varianza
- CA:** Campo Abierto
- cDNA:** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- CORT:** Corticosterona
- CRH:** Hormona liberadora de corticotrofina
- CTX:** Corteza cerebral
- DHT:** Dihidrotestosterona
- DSM IV:** Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales IV
- E:** Estrogenos
- ED:** Enterramiento Defensivo
- ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- FST:** Force Swimming Test
- GnRH:** Hormona liberadora de gonadotrofina
- HHA:** Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal
- ISRSS:** Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
- LEC:** Laberinto En Cruz
- NPV:** Núcleo Paraventricular
- OVX:** Ovariectomia

**P4:** Progesterona

**P450 scc:** Enzima esterificante del colesterol

**PK A:** Proteína Kinasa A

**RNAm:** Ácido ribonucleico mensajero

**SHAM:** Cirugía simulada

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico

**SPM:** Síndrome Premenstrual

**T:** Testosterona

**TAE:** Tiempo Acumulativo de Enterramiento

**TDPM:** Trastorno Disfórico Premenstrual

**THDOC:** Tetrahydrodeoxicorticosterona

**VEH:** Vehículo

**VP:** Vasopresina

**WKY:** Wistar Kyoto

## RELACIÓN DE FIGURAS

**Figura 1.** Liberación de CORT

**Figura 2.** Biosíntesis de ALLO

**Figura 3.** Enterramiento Defensivo

**Figura 4.** Fase del ciclo estral de la rata

**Figura 5.** Efecto de progesterona sobre las conductas de enterramiento y acicalamiento en el modelo de enterramiento defensivo en la cepa Wistar

**Figura 6.** Efecto de la progesterona sobre la suma de conductas pasivas (Congelamiento e Inmovilidad) en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa Wistar

**Figura 7.** Efecto de progesterona sobre las conductas de enterramiento y acicalamiento en el modelo de enterramiento defensivo en la cepa WKY

**Figura 8.** Efecto de la progesterona sobre la suma de conductas pasivas (Congelamiento e Inmovilidad) en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa WKY

**Figura 9.** Efecto de 1.0 mg/Kg de progesterona sobre los niveles de corticosterona en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa Wistar

**Figura 10.** Efecto de 1.0 mg/Kg de progesterona sobre los niveles de corticosterona en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa WKY

**Figura 11.** Efecto de 1.0 mg/Kg de progesterona sobre los niveles de alopregnanolona en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa Wistar

**Figura 12.** Efecto de 1.0 mg/Kg de progesterona sobre los niveles de alopregnanolona en plasma en la cepa Wistar Kyoto

**Figura 13.** Efecto de la  $P_4$  sobre la expresión de  $5\alpha$ -R2 en hipocampo sometidas a enterramiento defensivo

**Figura 14.** Efecto de la  $P_4$  sobre la expresión de  $5\alpha$ -R2 en hipocampo de ratas WKY sometidas a Enterramiento Defensivo

## RELACIÓN DE DIAGRAMAS

**Diagrama 1.** Diseño experimental de grupos a tratar

## RELACIÓN DE TABLAS

**Tabla 1.** Respuesta defensiva de roedores

**Tabla 2.** Principales perfiles de comportamientos en modelos experimentales de ansiedad y depresión

**Tabla 3.** Ciclos y condiciones de 5 $\alpha$ -R2 y cyclofilina

**Tabla 4.** Efecto de la progesterona sobre el erguimiento, exploración al electrodo y número de choques recibidos en el modelo de campo abierto en la cepa Wistar

**Tabla 5.** Efecto de la progesterona sobre la conducta de Erguimiento, Exploración al electrodo, número de choques recibidos en el modelo de ED en la cepa WKY

**Tabla 6.** Efecto de la progesterona sobre el número de cuadros cruzados en el modelo de campo abierto en la cepa Wistar

**Tabla 7.** Efecto de la progesterona sobre el número de cuadros cruzados en el modelo de campo abierto en la cepa WKY

# ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	8
<b>RELACIÓN DE FIGURAS</b> .....	10
<b>RELACIÓN DE DIAGRAMAS</b> .....	10
<b>RELACIÓN DE TABLAS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	16
2.1.Síndrome Premenstrual (SPM) .....	16
2.2.Etiología del SPM .....	18
2.3.Ansiedad.....	19
2.4.Ansiedad en animales .....	21
2.5.Ansiedad y niveles hormonales .....	21
2.5.1 Corticosterona .....	22
2.5.2 Progesterona .....	23
2.6.Progesterona, 5 $\alpha$ -Reductasa y alopregnanolona .....	25
2.7.Modelos animales .....	27
2.8.Enterramiento Defensivo (ED) .....	28
2.9.WKY como modelo animal .....	31
2.10.Ciclo estral de la rata .....	33
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	35
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	36
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	37
5.1.General .....	37
5.2.Particular .....	37
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
6.1.Animales .....	38
6.2.Ovariectomía (OVX) y falsa cirugía (SHAM).....	38
6.3.Ciclo estral .....	39
6.4.Enterramiento Defensivo .....	40
6.5.Campo Abierto .....	40
6.6.Reacción de la transcriptasa reversa en cadena de la polimerasa (PCR).....	41
6.7.Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) .....	43
6.8.Análisis estadístico.....	44

<b>7.RESULTADOS</b> .....	45
7.1. Efecto de la progesterona sobre la ansiedad experimental	
7.1.1. Wistar.....	45
7.1.1.1.Conductas activas.....	45
7.1.1.2.Suma de conductas pasivas.....	46
7.1.2. WKY.....	47
7.1.2.1Conductas activas .....	48
7.1.2.2 Suma de conductas pasivas .....	49
7.2. Efecto de la progesterona sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona	
7.2.1. Wistar.....	50
7.2.2. WKY.....	51
7.3. Efecto de la progesterona sobre las concentraciones plasmáticas de alopregnanolona	
7.3.1. Wistar.....	52
7.3.2. WKY.....	53
7.4. Efecto de la progesterona sobre la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R <sub>2</sub> en hipocampo	
7.4.1 Wistar.....	54
7.4.2. WKY.....	55
7.5 Campo Abierto	
7.5.1 Wistar.....	56
7.5.2 WKY.....	57
<b>8.DISCUSIÓN</b> .....	58
8.1. Efecto de la progesterona sobre la ansiedad experimental .....	58
8.2. Efecto de la progesterona sobre los niveles plasmáticos de corticosterona .....	59
8.3. Efecto de la progesterona sobre los niveles plasmáticos de alopregnanolona .....	60
8.4. Efecto de la progesterona sobre la expresión del RNAm de la enzima 5 $\alpha$ -R <sub>2</sub> en hipocampo .....	61
8.5. Campo Abierto .....	62
<b>9.CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>10.BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64
<b>11. ANEXO</b> .....	76

## RESUMEN

En la actualidad ha aumentado la frecuencia de trastornos ansiosos y depresivos, estos trastornos emocionales se exacerbaban debido a que el estrés se combina con algunos cambios fisiológicos como la disminución de hormonas. En la mujer hay tres etapas de la vida reproductiva en las cuales puede haber mayor incidencia de trastornos psiquiátricos como ansiedad y depresión, una de ellas es el síndrome premenstrual (SPM).

La etiología de este trastorno no se conoce a fondo pero existen estudios que señalan la caída brusca de progesterona ( $P_4$ ) y su metabolito  $5\alpha$  reducido ( $5\alpha$ -R), alopregnanolona (ALLO), como responsables de algunos síntomas del trastorno, como la ansiedad. Más aún, el efecto ansiolítico y antidepresivo de la  $P_4$  se debe a su metabolito ALLO. Por otro lado, se ha vinculado al eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HHA) como responsable de algunos de los síntomas del SPM. Por ejemplo, estudios preliminares indican el efecto ansiolítico de la  $P_4$  no se observa en la cepa Wistar Kyoto (WKY), una cepa cuyo eje HHA es hiperactivo, lo que sugiere que alguno de los mecanismos que intervienen en la síntesis de ALLO podría estar alterado.

Dado que la cepa WKY es un modelo animal en donde se expresan conductas tipo ansiosa y depresiva, dos síntomas claves del SPM, y son hiper-reativas al estrés, se cuantificó la isoenzima  $5\alpha$ -R2, niveles de alopregnanolona y corticosterona en respuesta a la administración de progesterona, utilizando como control la cepa Wistar.

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar y WKY, se formaron de manera aleatoria dos grupos por cepa, ovariectomizados (OVX) y SHAM (cirugía simulada), para ser sometidos a la prueba de ansiedad experimental, enterramiento defensivo (ED) y así cuantificar los comportamientos característicos de esta prueba. A su vez estos grupos se subdividieron en tratados con vehículo (VEH; Aceite de maíz; 0.2mL/rata, s.c.) y con  $P_4$  (0.25, 0.5 y 1.0 mg/Kg; 0.2mL/rata, s.c), en una sola dosis. 40 minutos más tarde de la administración del tratamiento respectivo, los animales fueron sometidos al modelo conductual, posteriormente los animales fueron sacrificados para así obtener muestras sanguíneas del tronco, para medir los niveles plasmáticos de ALLO y CORT, utilizando la prueba de ELISA y se colectó el tejido cerebral, para cuantificar la enzima  $5\alpha$ -R2 en hipocampo, utilizando la técnica de PCR.

Los resultados del presente estudio demostraron que el efecto ansiolítico de la  $P_4$  depende de la cepa estudiada ya que 1.0 mg/kg de  $P_4$  modificó la conducta ansiosa en la cepa Wistar. En la cepa WKY la  $P_4$  redujo los niveles de CORT pero

no se observaron cambios en las concentraciones de ALLO, ni la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2. Por otro lado en la cepa Wistar la administración de P<sub>4</sub> no modifico los niveles plasmáticos de CORT, a pesar de ver el efecto ansiolítico en conductas activas, y la P<sub>4</sub> redujo la concentración plasmática de ALLO. En la cepa Wistar la administración de P<sub>4</sub> Incrementó la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2, lo que nos indica que los animales de la cepa Wistar están respondiendo al tratamiento con P<sub>4</sub>.

## 1.INTRODUCCIÓN

En la actualidad debido a problemas socioeconómicos, ambientales, estrés laboral y/o dinámicas sociales ha aumentado la frecuencia de trastornos ansiosos y depresivos. Estos trastornos emocionales se exacerban debido a que el estrés se combina con algunos cambios fisiológicos como es la disminución de hormonas ováricas (Rodríguez-Landa et al., 2009).

Hoy en día se sabe que en el género femenino existe una mayor incidencia de ansiedad, depresión y trastornos emocionales en comparación con individuos del sexo masculino (Rodríguez-Landa y Contreras, 1998). Lo anterior se ha atribuido principalmente a cambios en los niveles de hormonas ováricas. Asimismo, se ha demostrado que en la mujer hay tres etapas muy particulares en las cuales puede haber mayor incidencia de irritabilidad, ansiedad y depresión: estas son periodo premenstrual, postparto y climaterio (Rodríguez-Landa et al., 2009).

El síndrome premenstrual (SPM) es una alteración física y emocional que padecen las mujeres días antes del periodo menstrual, y puede extenderse hasta después de él (Cheng et al., 2013). El SPM está vinculado a la ansiedad, alrededor del 75-95% de las mujeres en sus años fértiles son afectadas por la ansiedad y una serie de síntomas menstruales a niveles más altos de lo común, como es ánimo deprimido, angustia, fobia, cambios de humor, distensión abdominal, estrés, fatiga, problemas de concentración, tumescencia de los senos, entre otras, siendo incapacitantes en el ámbito familiar, laboral y social (Carvalho et al., 2012; Dávila, 2011). Los síntomas premenstruales aumentan a partir de los 20 hasta los 35 años y es posible que las mujeres sean más vulnerables en el grupo de edad en el que tienen familia y trabajo, ya que el estrés es un factor que puede empeorar los síntomas premenstruales (Campagne y Campagne, 2007; Nyberg, 2011).

La etiología del SPM no se conoce a fondo pero existen algunos estudios que señalan la caída brusca de progesterona ( $P_4$ ) y sus metabolitos  $5\alpha$  reducido ( $5\alpha$ -R), alopregnanolona (ALLO), como responsables de algunos síntomas del trastorno, como la ansiedad y la depresión, de hecho se han asociado a la

gravedad de los síntomas. Así en modelos animales, Gallo y Smith (1993) mostraron que 24 horas después de la suspensión de la administración prolongada y sostenida de progesterona aumenta la respuesta de ratas hembras a un estímulo eléctrico usando un modelo de ansiedad (Enterramiento defensivo, ED), es decir genera un estado “tipo ansiedad”. Por lo que la administración de  $P_4$  y ALLO reducen la expresión de conductas relacionadas con ansiedad (Rodríguez-Landa et al., 2009).

Se sabe que la administración de  $P_4$  o ALLO inducen un efecto tipo ansiolítico en la cepa Wistar, sin embargo en la cepa Wistar Kyoto (WKY) no se observa este efecto (Estrada-Camarena et al., 2011). La cepa WKY se propone como modelo animal de ansiedad y depresión ya que son ratas hiper-reativas fisiológica y conductualmente al estrés (Kalueff y Tuohimaa, 2004), esta cepa surge a partir de la cepa Wistar como control de ratas hipertensas, además muestra hormonal, conductual y fisiológicamente signos que emulan a los síntomas encontrados en pacientes depresivos (Cassano y Argibay, 2010; Will et al., 2003).

Dado que el efecto tipo ansiolítico de la  $P_4$  se ha vinculado a la producción de su metabolito, ALLO por la enzima  $5\alpha$ -R, es posible que en la cepa WKY la expresión de esta enzima, sea menor en comparación a Wistar y por ello, no se lleve a cabo la regulación del eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HHA) de manera eficaz. Por lo anterior se plantea cuantificar en la cepa WKY la isoenzima  $5\alpha$ -R2, niveles de ALLO y Corticosterona (CORT) en respuesta a la administración de progesterona, utilizando como control la cepa Wistar.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Síndrome Premenstrual (SPM)**

El SPM es un grupo de síntomas psicológicos y físicos que sufren las mujeres regularmente durante la fase lútea del periodo menstrual y se mejora al final de este (Cheng et al., 2013; Indusekhar et al., 2007).

La primera investigación sistemática acerca del SPM fue presentada en 1931, cuando Robert T. Frank, en la Academia de Medicina de Nueva York, dio la primera descripción de la enfermedad manifestada por un gran número de mujeres durante la fase reproductiva. “Tensión Premenstrual” fue el nombre que se le dio, los síntomas fueron reportados como diferentes “grados de ansiedad que preceden al sangrado”. Posteriormente en 1953 se acuñó el nombre de “Síndrome Premenstrual” por el Dr. John Greene y la Dra. Catarina Dalton, este término fue aplicado a los síntomas físicos y psicológicos que ocurren hasta dos semanas antes de la menstruación con el alivio después del inicio del período menstrual (citado en Rapkin, 2003). Las mujeres con SPM experimentan síntomas menstruales a niveles más altos de lo común, llegan a presentar síntomas físicos y emocionales severos que pueden ser incapacitantes (Cheng et al., 2013).

Hace más de 20 años el SPM era considerado como un conjunto de síntomas “exagerados” por quienes los presentaban, hoy en día es visto como parte de un padecimiento psiquiátrico vinculado principalmente a la ansiedad. Alrededor del 75 - 95% de las mujeres en sus años fértiles son afectadas por la ansiedad (Carvalho et al., 2012), además de una serie de síntomas físicos como dolor muscular, fatiga, edema en las extremidades, dolor y tumescencia de los senos, algunas se ven imposibilitadas a realizar sus actividades cotidianas con normalidad, incluso, algunas otras llegan al hospital y son tratadas con analgésicos fuertes, otras más pueden presentar trastornos emocionales como angustia, fobia (Dávila, 2011), depresión, pérdida del libido, cambios de humor, además de distensión abdominal, estrés, dolor de cabeza, trastornos de sueño, problemas de concentración y cambios en el consumo de carbohidratos (Campagne y Campagne, 2007). Los

síntomas aumentan de los veinte hasta los treinta y cinco años y es posible que, mujeres mayores sean más vulnerables porque tienen que desempeñar un rol familiar y laboral, ya que el estrés es un factor que puede empeorar los síntomas premenstruales (Nyberg, 2011).

La forma severa y predominantemente psicológica de SPM es conocida como Trastorno Disfórico Premenstrual (TDPM; Cheng et al., 2013) y aproximadamente del 2 al 6% de las mujeres la presenta (Bose et al., 2008). A diferencia del SPM, en el TDPM los síntomas psicológicos superan los síntomas físicos. En los últimos años se ha postulado que la mujer con TDPM es más vulnerable a desarrollar depresión post-parto y esta situación puede predisponerlas a sufrir depresión durante la transición menopáusica, por lo tanto estas patologías pueden contribuir a una calidad de vida deficiente, de la pubertad a la menopausia (Estrada-Camarena et al., 2011; Rapkin, 2009). Es importante señalar que en nuestro país no existen estudios epidemiológicos que proporcionen información sobre la prevalencia y/o incidencia de estos padecimientos, por lo que es muy factible que esta población no esté atendida.

De acuerdo a Biggs y Demuth (2011) las mujeres con SPM presentan un patrón de signos cada mes. Para conocer si la mujer presenta o no dicho síndrome, los síntomas deben:

- Estar presentes durante más de una semana, antes de la menstruación y disminuir unos días después de la aparición del periodo menstrual.
- Más de cinco síntomas deben de presentarse en la mayoría de los ciclos menstruales, durante los últimos 12 meses.
- Interferir en algunas de sus actividades normales.

Existen diferentes opciones de tratamiento para erradicar los síntomas del SPM. Una de ellas es a través de Inhibidores selectivos de la recaptura de Serotonina (ISRSs) y progestinas, mientras que en casos más severos son tratados con agonistas de la Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH, por sus siglas en Inglés) o se induce la anovulación, a través de la ablación de la función ovárica por

ooforectomía (Último recurso disponible a menos que existan trastornos ginecológicos concomitantes) (Estrada-Camarena et al., 2011; Hernández, 2005; Indusekhar et al., 2006).

## **2.2 Etiología del SPM**

La etiología exacta del SPM no ha sido del todo esclarecida, por lo que algunos grupos de investigación han intentado explicar los síntomas del SPM relacionando una alteración en los niveles de hormonas gonadales, pérdida de balance electrolítico, factores involucrados en la homeostasis del calcio, alteración en el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HHA) y/o desequilibrio en la función del sistema GABAérgico (Alopregnanolona, ALLO; Bose et al., 2008; Estrada-Camarena et al., 2011).

Algunos estudios muestran que la función del eje HHA en el SPM está alterado, ya que el incremento en los niveles plasmáticos de cortisol, vasopresina (VP) y de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) observados en mujeres sanas en respuesta al estrés, no se observan en mujeres con SPM, lo que sugiere que el sistema de respuesta está abatido (Estrada-Camarena et al., 2011; Girdler et al., 2001). Una de las propuestas que trata de explicar esta alteración funcional es que la regulación del HHA por los neuroesteroides no se lleva a cabo de manera eficaz (Girdler et al., 2001).

Más aún, una de las hipótesis que explica la etiología del SPM se basa en relacionar el descenso brusco en los niveles plasmáticos y cerebrales de  $P_4$  y su metabolito ALLO con el incremento de las conductas ansiosas (Contreras et al., 2006; Almela et al., 2007). Estos cuadros ansiosos son efectos secundarios de los inhibidores de  $5\alpha$ -R (enzima participante en la conversión de  $P_4$  en ALLO) tales como finasterida y dutasterida, por lo que se ha propuesto la posible relación entre la falta de neuroesteroides y el desarrollo de cuadros ansiosos (Gutiérrez-García et al., 2000). La diferencia entre estos dos inhibidores es que la finasterida inhibe selectivamente la isoenzima tipo 2 de  $5\alpha$ -R (la enzima responsable de

convertir la P<sub>4</sub> a ALLO), mientras que la dutasterida inhibe tanto tipo 1 y tipo 2 de 5 $\alpha$ -R (Curtis, 2004).

Estudios en animales sugieren que la finasterida inhibe la actividad de 5 $\alpha$ -R en algunas regiones del cerebro como es el hipocampo lo que reduce la producción de ALLO, induciendo cambios conductuales y de humor (Finn et al., 2006; Rahimi-Ardabili et al., 2006).

Más evidencias sobre la posible relación de los neuroesteroides y los cuadros ansiosos muestran que las concentraciones de 5 $\alpha$ -R están en menor cantidad en pacientes ansiosos y/o deprimidos y por medio de antidepresivos y antipsicóticos puede aumentar la expresión de 5 $\alpha$ -R (Römer et al., 2010).

### **2.3. Ansiedad**

Hace algunos años era más frecuente en el SPM la presencia del padecimiento con depresión, pero en la actualidad, con diagnósticos más precisos, se puede concluir que es más ordinaria la relación SPM– Ansiedad (Dávila, 2011).

Si a un cuadro de ansiedad se le añade uno de angustia (Respuestas fisiológicas, como incremento en la frecuencia cardiaca, temblores, falta de aliento, terror, sofocación y alteraciones gastrointestinales), puede entenderse que muchas mujeres entren en un proceso que puede resultar incapacitante (Dávila., 2011).

La ansiedad puede ser una emoción normal o un trastorno psiquiátrico, dependiendo de su intensidad y de su repercusión sobre la actividad de la persona. En condiciones normales constituye uno de los impulsos vitales que motiva al individuo a realizar sus funciones y a enfrentarse a situaciones nuevas (Hurlé, 2012), permite la adaptación a circunstancias amenazadoras y se considera que forma parte de la reacción evolutiva de supervivencia de lucha-huida (Hernández, 2005). Cuando un individuo se enfrenta a una situación de peligro se puede observar un conjunto de cambios conductuales y vegetativos orientado a contender de manera adecuada con dicha situación. Por lo tanto, la

ansiedad representa una estrategia adaptativa que proporciona al organismo un mecanismo de alarma que lo prepara para enfrentarse a una situación de peligro (Gómez et al., 2002). Sin embargo cuando la respuesta de ansiedad ante el estímulo desencadenante es desproporcionada, en intensidad y duración, constituye una mala adaptación o respuesta inapropiada y se convierte en una ansiedad patológica (trastorno psiquiátrico; Luna et al., 2001) que en lugar de favorecer el comportamiento, interfiere en él y el individuo desplaza toda su atención hacia ésta (Hurlé, 2012).

En términos patológicos, la ansiedad puede describirse como la vivencia de un sentimiento de amenaza, de expectación tensa ante el futuro y de alteración del equilibrio psicosomático en ausencia de un peligro real o, por lo menos desproporcionada en relación con el estímulo desencadenante (Hurlé, 2012).

La ansiedad se acompaña de malestar caracterizado por intranquilidad, expectación aprehensiva y aumento de la vigilancia en ausencia de un estímulo desencadenante, irritabilidad que puede llegar a la pérdida de la capacidad de concentración, además también se manifiestan sensaciones somáticas como sudoración, taquicardia, alteraciones gastrointestinales, tensión muscular, náuseas, palpitaciones, cefalea, mialgias, micciones frecuentes, insomnio, e inclusive diarrea, lo cual causa una aflicción clínicamente significativa o un deterioro de la función social, laboral o de otras áreas importantes de la vida (Gómez et al., 2002; Hernández, 2005; Hurlé, 2012).

El Inventario de Enfermedades Psiquiátricas, editado por la Asociación Norteamericana de Psiquiatría: en la revisión del Manual Diagnóstico y Estadístico 4ta edición (DSM-IV TR, por sus siglas en inglés; 2000), indica que la sintomatología deberá persistir durante por lo menos seis meses, aunque algunos individuos consideren que han padecido de ansiedad durante toda su vida (*American Psychiatric Association, 2000*).

## **2.4. Ansiedad en animales**

Muchos animales también son capaces de pasar por estados semejantes a la ansiedad. El estado de ansiedad en los animales al igual que en los humanos aparece cuando se detecta un peligro o amenaza potencial, en estos casos, la amenaza es indicada por estímulos, innatos o aprendidos, que señalizan peligro, por ejemplo, el olor de un predador puede indicar la presencia próxima del mismo, permitiendo al animal esconderse, abandonar el lugar o ejecutar cualquier otro comportamiento que impida el contacto directo con el predador (Becerra-García et al., 2007).

Estos comportamientos pueden ser observados en situaciones naturales, o en laboratorios. Una de las pruebas para inducir ansiedad en el laboratorio es el modelo de enterramiento defensivo (ED; Becerra-García et al., 2007).

## **2.5. Ansiedad y niveles hormonales**

La ansiedad también puede definirse como uno de los procesos cerebrales (respuesta involuntaria) involucrados en la sobrevivencia de diferentes especies animales, especialmente de aquellas que por su naturaleza son víctimas de los depredadores, siendo esto una situación de peligro (Gómez et al., 2002).

Se sabe que ante una situación de amenaza o peligro, el organismo reacciona poniendo en marcha mecanismos tanto del sistema nervioso central (SNC), como del sistema nervioso periférico (SNP), específicamente del sistema nervioso autónomo y del sistema neuroendocrino a través del eje HHA (Cárdenas, 2012). Las hormonas esteroides pueden modular la excitabilidad de las neuronas del hipotálamo por mecanismos genómicos y no genómicos, que a su vez podrían estar involucradas en el control de la actividad del eje HHA (Carvalho et al., 2012), cuyo producto final son los glucocorticoides (específicamente corticosterona, CORT) y otras hormonas, las cuales influyen en el funcionamiento de diversos

sistemas fisiológicos, dada la existencia de receptores específicos para ellas en varias estructuras del organismo (Cárdenas, 2012).

### 2.5.1 Corticosterona

La CORT es un glucocorticoide liberado por la zona fascicular de la corteza suprarrenal. Cuando la amígdala transmite estímulos al hipotálamo, se activa el eje HHA. El Núcleo Paraventricular (NPV) libera la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula a la hipófisis dando como resultado la síntesis y liberación de la ACTH, la cual tiene como órgano diana la glándula adrenal. El aumento en la secreción de la hormona ACTH induce la síntesis de CORT, la cual se incorpora a la circulación general (Figura 1; Briones, 2006; García, 2007;

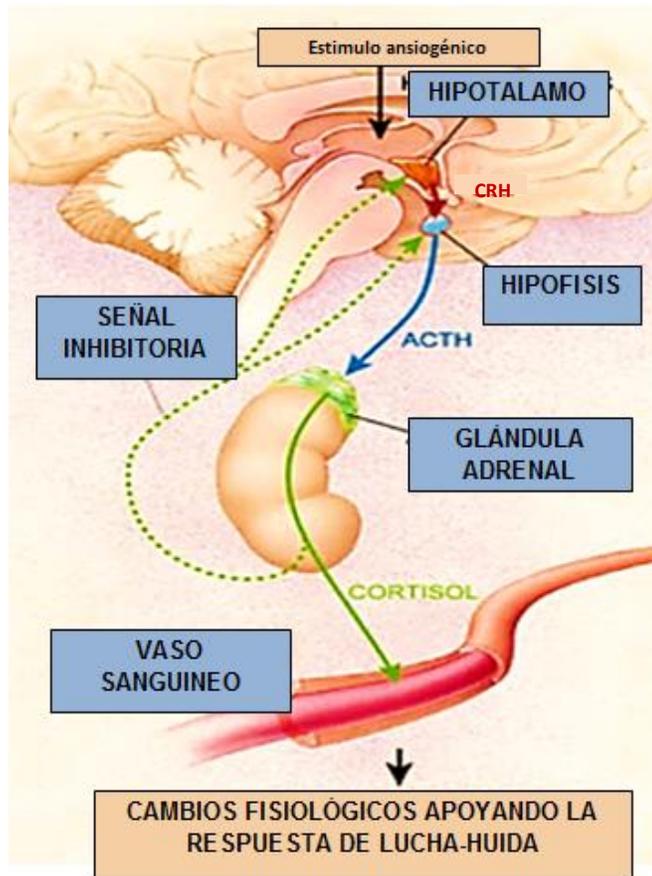


Figura 1. Liberación de CORT. CRH, hormona liberadora de corticotropina, ACTH, hormona adrenocorticotropa (Modificado de Justel et al., 2009).

Henderson, 2007; Leonard, 2006; Rapkin, 2009), habiendo sido descrita la concentración máxima de esta hormona a los 15 y 30 minutos después de haber comenzado la situación estresante (Cárdenas, 2012).

Como ya se sabe los estímulos estresantes activan el eje HHA (en el NPV), aumentando la liberación de cortisol/CORT (cortisol en humanos, corticosterona en animales), esta hormona ha sido asociada a un mayor rendimiento energético del organismo: elevación de energía, aumento de la ingesta alimenticia (en

especial de carbohidratos, puede asociarse al deseo compulsivo de consumir dulces propio de la ansiedad o también conocido como “craving” de dulces), aumento del umbral al dolor y disminución de la respuesta inflamatoria (Tesler y Arias, 2007).

La CORT bajo condiciones normales regula los cambios metabólicos que contribuyen hacer frente con la situación estresante e inicia la retroalimentación negativa que controla la actividad del eje HHA, mientras que una alta producción de CORT tiene un efecto dañino sobre las neuronas del hipocampo, las atrofian, disminuye el número de dendritas y se empequeñecen, afectan el metabolismo de la glucosa, incrementan el flujo sanguíneo y elevan la presión sanguínea, además actúa directamente sobre el sistema inmunológico con efectos supresores, favoreciendo la aparición de enfermedades autoinmunes o infecciosas (Estrada-Camarena et al., 2011; Rapkin, 2009).

### **2.5.2 Progesterona**

Además de la CORT, las variaciones hormonales gonadales de la  $P_4$  influyen en la regulación del estado de ánimo, durante el SPM, se sabe que los niveles de  $P_4$  disminuyen rápidamente antes de la menstruación, por lo que, se ha relacionado la caída de esta hormona con el incremento en la ansiedad (Fernández- Guasti y Picazo, 1992)

La  $P_4$  es sintetizada en los ovarios y en el cerebro para formar el potente esteroide neuroactivo ALLO y pregnanolona, los cuales son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA-A y a dosis muy altas lo activa en ausencia del neurotransmisor (Carvalho et al., 2012).

Se sabe que los metabolitos de la  $P_4$  son bifásicos, es decir en altas concentraciones, pregnanolona y ALLO producen efectos ansiolíticos, sedantes, antiepilépticos y efectos anestésicos, mientras que a niveles sanguíneos más bajos, similares a los observados durante la fase lútea, ALLO puede causar

ansiedad, agresión, comportamiento impulsivo, y el estado de ánimo negativo en algunos individuos (Carvalho et al., 2012).

Se sabe que la administración de  $P_4$  produce una clara actividad ansiolítica (Fernández-Guasti y Picazo, 1992). Además, Martínez-Mota et al (2000) reportó que la administración de  $P_4$  (1.0 y 2.0 mg/rata) durante la prueba de ED produjo una disminución en tiempo acumulativo de enterramiento, indicando una posible respuesta ansiolítica. De lo anterior se puede suponer que las hormonas de origen ovárico influyen de manera importante en la mediación de la ansiedad (Fernández-Guasti y Picazo, 1992).

La  $P_4$  y sus metabolitos reducidos se comportan como agonistas alostéricos del complejo receptor  $GABA_A$ /benzodiazepina/ $Cl^-$ , de igual forma que la mayoría de los fármacos ansiolíticos conocidos, lo que se relaciona con los efectos anestésicos, hipnóticos y ansiolíticos de algunos progestágenos (Gutiérrez-García et al., 2000). La  $P_4$  puede interactuar con receptores  $GABA$ /benzodiazepina por lo menos de al menos 3 mecanismos no exclusivos: **(1)** por la estimulación directa del receptor  $GABA_A$ , **(2)** por su conversión a metabolito reducido, y **(3)** por la interacción del receptor  $GABA$  con el precursor de la  $P_4$ , pregnanolona, esto ocurre después de su conversión a metabolito reducido (Fernández-Guasti y Picazo, 1992).

La enzima responsable de la conversión de  $P_4$  es la  $5\alpha$ - reductasa ( $5\alpha$ -R), la cual está presente en las áreas cerebrales estrechamente relacionada con la regulación de la ansiedad (Hipotálamo, hipocampo, NPV, amígdala) (Fernández-Guasti y Picazo, 1992).

## 2.6. Progesterona, 5 $\alpha$ -Reductasa y alopregnanolona

Es evidente que la ALLO es uno de los metabolitos más potentes de la P<sub>4</sub>, para que esta conversión se lleve a cabo interviene la 5 $\alpha$ -R (Löfgreen et al., 2008).

La 5 $\alpha$ -R es considerada una enzima constitutiva que protege neuronas de los efectos del exceso de glucocorticoides, esta enzima está presente en diversas regiones cerebrales, incluyendo la corteza cerebral (CTX), hipocampo, PVN, amígdala y se presenta en dos isoformas: tipo I (5 $\alpha$ -R1) y tipo II (5 $\alpha$ -R2), encargadas de mediar la conversión de deoxycorticosterona (DOC) a tetrahydrodeoxycorticosterona (THDOC), de testosterona (T) a dihidrotestosterona (DHT) y además de la ya mencionada conversión de P<sub>4</sub> a ALLO (Sánchez et al., 2007).

La ALLO es producida en el cerebro y en la corteza adrenal (Sánchez et al., 2007). Esta hormona está implicada en respuestas homeostáticas del organismo. Se sabe que la P<sub>4</sub> y sus metabolitos 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -R forman parte activa en la funcionalidad

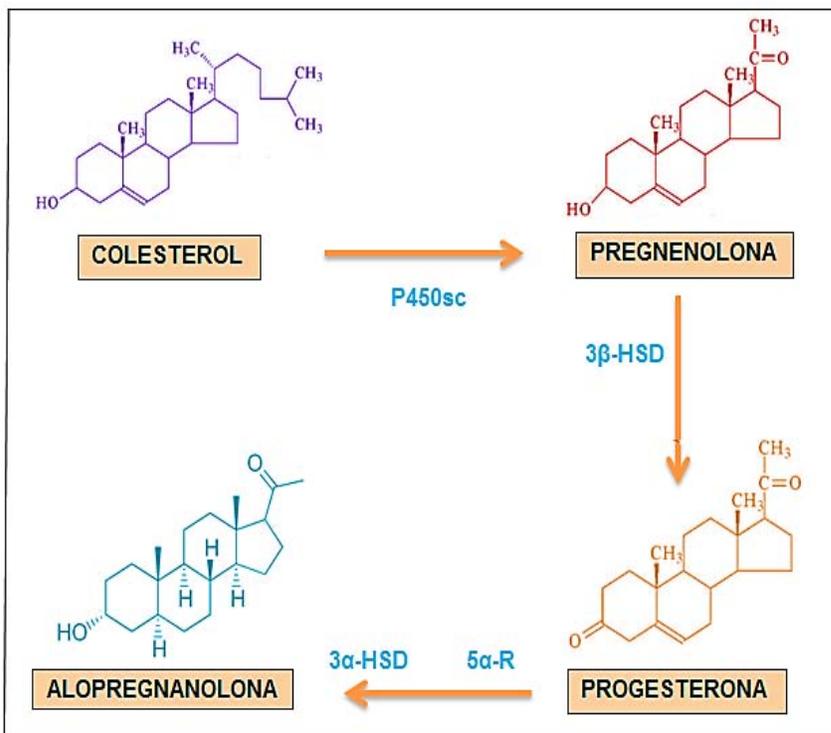


Fig. 2 Biosíntesis de ALLO (Modificado de Mendoza, 2008). P450sc, Enzima esterificante del colesterol; 3 $\beta$ -HSD, 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3 $\alpha$ -HSD, 3 alfa- hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5 $\alpha$ -R, 5 alfa- Reductasa.

del sistema GABAérgico y HHA en respuesta al estrés. En este sentido, en respuesta a un estresor se activa el eje HHA y disminuye la actividad inhibitoria de GABA a través del receptor GABA<sub>A</sub>. Posteriormente, las glándulas adrenales producen ALLO, incrementando los niveles de éste

esteroide neuroactivo a nivel plasmático y cerebral, lo que tiene como consecuencia el incremento del tono GABAérgico y la inhibición del HHA. Por lo que la ALLO es considerada como un regulador del funcionamiento del HHA (Contreras et al, 2006; Girdler et al., 2001; Sánchez et al., 2007).

El primer paso en la biosíntesis está controlado por la unión de la hormona LH a su receptor, resultando en la síntesis de AMP cíclico y activación de la proteína quinasa A (PKA). La PKA promueve la fosforilación de una proteína que transporta el colesterol desde sus depósitos intracelulares hacia la mitocondria, donde es convertido en pregnenolona por la enzima dependiente del citocromo P450 llamada desmolasa o P450sc (enzima esterificante del colesterol). La pregnanolona es convertida en  $P_4$  por la enzima  $3\beta$ -HSD. Posteriormente la  $P_4$  por medio de  $5\alpha$ -R1/ $5\alpha$ -R2 y  $3\alpha$ -HSD, se metaboliza a ALLO (Figura 2; Gutiérrez-García et al., 2000; Ñariño et al., 2005; Sánchez et al., 2007).

Los niveles de ALLO varían al igual que la  $P_4$  con un incremento en la fase lútea del ciclo menstrual de la mujer. La ALLO tiene una acción bimodal en los cambios del estado de ánimo similar a las benzodiazepinas, barbitúricos y al alcohol. En altas dosis produce un efecto ansiolítico, sedativo y antiepiléptico. Mientras que en un subconjunto de individuos (2- 3%) en dosis bajas causa severa reacciones emocionales. Sin embargo, algunos estudios han demostrado un nivel alto de ALLO en pacientes con SPM, sugiriendo la disfunción del receptor  $GABA_A$  (Indusekhar et al, 2006).

Se ha encontrado que la  $5\alpha$ -R2 está presente en algunas áreas del SNC del humano (cerebelo, bulbo raquídeo, hipocampo, hipotálamo), siendo el hipocampo y el hipotálamo áreas relacionadas con ansiedad (Arenas y Puigcerver, 2009; Rodríguez-Landa y Contreras, 1998; Sánchez, 2007).

Evidentemente las isoenzimas  $5\alpha$ -R1 y  $5\alpha$ -R2 intervienen en la conversión de  $P_4$  a ALLO, en un inicio se mencionó que la  $5\alpha$ -R2 era la responsable de dicha conversión. Si bien es cierto que la expresión de  $5\alpha$ -R2 se expresa en muy pocas

áreas localizadas del cerebro de rata a diferencia de  $5\alpha$ -R1, sin embargo la similitud de la secuencia entre humano y rata de la  $5\alpha$ -R2 es del 77%, mientras que para la isoenzima tipo 1 es del 60% (Celotti et al., 1997), por lo que en este estudio se cuantificó la expresión de la enzima  $5\alpha$ -R2 en hipocampo, estructura relacionada con el aprendizaje, memoria, y regulación de estados emocionales por su importante participación en el sistema límbico (Arenas y Puigcerver, 2009; Rodríguez-Landa y Contreras, 1998).

## 2.7. Modelos animales

Un modelo es una especie no humana utilizada para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al hombre y a los animales, además de sus importantes aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, sin el riesgo añadido de dañar a un ser humano o animal durante el proceso real (Hernández, 2006). Hay tres tipos principales de modelos animales homólogos, isomorfos y predictivos. Los **homólogos** poseen la misma etiología, síntomas y opciones de tratamiento como los humanos que tienen la misma enfermedad. Los modelos animales **isomórficos** comparten los mismos síntomas y tratamientos, si bien se provocan artificialmente en el laboratorio, de modo que no reflejan la etiología normal. Esta es la herramienta de investigación de principio, mientras que los modelos **predictivos** predicen aspectos de enfermedades, como su respuesta a diferentes fármacos. Este método se utiliza comúnmente cuando los investigadores no saben la causa de una enfermedad (Polanco et al., 2011). Un modelo predictivo permite hacer determinadas predicciones sobre el trastorno del que sirve de modelo. Un modelo isomórfico permite hacer predicciones y estudiar los mecanismos en que se basa el trastorno. Un modelo homólogo sirve para estudiar todos los aspectos de un trastorno, incluidas sus causas (Polanco et al., 2011).

Para el estudio de trastornos psiquiátricos un modelo animal debe cumplir los siguientes criterios, **a) Validez:** deben ser análogos a los trastornos humanos en su sintomatología. **b) Confiabilidad:** los resultados deben tener una alta tasa de

reproductibilidad. **c) Validez predictiva:** la condición debe ser mejorada o atenuada por tratamientos efectivos en el tratamiento de trastornos humanos. **d) Validez de constructo:** cambios en el modelo deben estar estrechamente correspondidos a cambios en parámetros neuroquímicos o endocrinos descritos en pacientes (Estrada-Camarena et al., 2011).

Las evidencias sugieren que los trastornos ansiosos específicos de los seres humanos reflejan la disfunción de diferentes subsistemas defensivos, por lo tanto, la validez y la confiabilidad de los modelos animales utilizados depende, en gran medida, de la prueba seleccionada y, en particular, de la naturaleza de las reacciones defensivas asociadas (Tabla 1; Gómez et al., 2002)

Tabla 1. Respuesta defensiva de roedores (Gómez et al., 2002).

**Respuestas defensivas de los roedores**

<i>Fuente de peligro</i>	<i>Respuesta típica</i>
Discreta (distante)	Escape o huida
Discreta (próxima)	Inmovilidad, atención, posturas laterales y supinas de defensa, ataque defensivo, enterramiento, vocalizaciones ultrasónicas
Indeterminada (potencial)	Evitación del área "peligrosa", tigmotaxis, asimilación del riesgo

**2.8. Enterramiento Defensivo (ED)**

La prueba de ED, se basa en una respuesta innata de los roedores de enterrar aquellos estímulos que les son amenazantes (Sollozo et al., 2011).

El ED es un paradigma de la ansiedad que permite una oportunidad para investigar tres tipos diferentes de respuestas conductuales similares a la ansiedad. Por lo tanto, después de recibir un choque a través de un electrodo, las ratas pueden exhibir respuestas activas (acicalamiento y enterramiento) o pasivas (congelamiento e inmovilidad) en proporciones variables (Rogel-Salazar y López-Rubalcava, 2011).

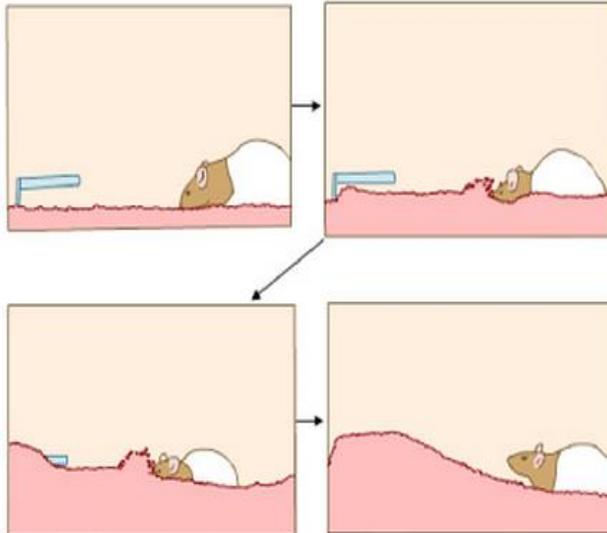


Fig 3. Enterramiento defensivo (Redolar R., 2008)

El tiempo invertido en enterrar la fuente aversiva es el principal indicador de ansiedad y los ansiolíticos disminuyen la conducta de enterramiento (Sollozo et al., 2011). En este modelo se cuantifica el tiempo total que el animal invierte en enterrar el estímulo aversivo (electrodo) durante 10 minutos. (Figura 3; Reyes y Fernández-Guasti, 2006).

El modelo ha sido modificado y se plantea que es posible evaluar también las conductas pasivas como reflejo de la ansiedad, así durante este procedimiento se cuantificarán los siguientes parámetros:

- **Latencia de enterramiento:** tiempo que tarda el animal en iniciar la conducta defensiva después recibir el primer choque eléctrico (De Boer y Koolhaas, 2003; Pinel y Treit 1978). Un aumento en la latencia de enterramiento se considera como una disminución de su reactividad o capacidad para responder a los estímulos (Fernández-Guasti et al., 1990; Martínez-Mota et al., 2000).
- **Tiempo acumulativo de enterramiento (TAE):** tiempo que el animal invierte en enterrar el electrodo, para la cual desplaza el aserrín con movimientos rápidos de las patas delanteras y la cabeza. Esta conducta refleja la ansiedad del animal, así a mayor tiempo de enterramiento, mayor ansiedad (De Boer y Koolhaas, 2003; Martínez-Mota et al., 2000; Pinel y Treit 1978).
- **Congelamiento:** se denomina congelamiento a la postura de inmovilidad del cuerpo, exceptuando movimiento de respiración, por lo general el animal se coloca en cuatro patas con la mirada fija dirigida al electrodo. La mayoría de las veces este comportamiento se presenta después de que el

animal recibe un choque eléctrico. Esta conducta es considerada como una expresión pasiva de ansiedad, una disminución de esta conducta es interpretada como una reducción de ansiedad (Bai Li et al., 2001; Cárdenas y Navarro, 2002; Rogel-Salazar y López Rubalcaba, 2011).

- **Acicalamiento:** en un estado natural la conducta de acicalamiento se despliega siguiendo un patrón céfalo-caudal, sin embargo cuando los roedores son sometidos a altos niveles de estrés, rompen con este patrón o se acicalan una sola parte del cuerpo. En este caso se cuantificará el tiempo acumulativo de acicalamiento dirigido al hocico (Kalueff y Tuohimaa, 2005). Así, una disminución en esta conducta es interpretada como un efecto ansiolítico (Rogel-Salazar G y López Rubalcaba C, 2011).
- **Inmovilidad:** Tiempo que el animal permanece con el cuerpo completamente inmóvil, excepto por movimientos pequeños de la cabeza (escaneo), permaneciendo en por lo menos tres patas (De Boer y Koolhaas, 2003; Sluyter et al., 1999).
- **Erguimientos:** número de veces que el animal se coloca con las extremidades traseras en una posición vertical, sobre todo haciendo movimientos u olfateando en el aire. Este movimiento es indicativo de la actividad locomotora del animal. Es decir el aumento en esta conducta indica una mayor prevalencia de ansiedad (Kalueff y Tuohimaa, 2005; De Boer y Koolhaas, 2003).
- **Exploración al electrodo:** número de veces que el animal hace acercamientos a la fuente del estímulo aversivo. Un mayor número de veces que genera esta conducta se interpreta como una disminución de miedo (Rejón-Orantes et al., 2002).
- **Número de choques recibidos:** número de estímulos que recibió el animal a través del electrodo. Esta conducta es indicativa del temor del animal. Un incremento en este parámetro es interpretado como una disminución de miedo y viceversa (De Boer y Koolhaas, 2003).

Se ha reportado que la P<sub>4</sub> cuando está presente, hay una disminución en el tiempo acumulativo de enterramiento y en fases como es proestro, metaestro y diestro, es decir cuando la P<sub>4</sub> está ausente, se ha reportado un aumento en el TAE (Fernández- Guasti y Picazo, 1992). Diversos grupos han mostrado que la administración de P<sub>4</sub> o ALLO con un descenso de la ansiedad, sin embargo en las ratas de la cepa WKY no se observa lo mismo, ya que al administrar P<sub>4</sub>, no se refleja el efecto ansiolítico (Fernández- Guasti y Picazo, 1992). Debido a que la cepa WKY muestra hiper-reactividad al estrés y la funcionalidad del eje HHA parece estar alterada es posible que la producción de neuroesteroides no sea la adecuada. Más aún, algunos reportes indican que la exposición al estrés crónico reduce la producción de ALLO en ratones (Dubrovsky, 2004; Rodríguez-Landa et al., 2009). Por lo anterior resulta de interés explorar si la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R, involucrada en la síntesis de ALLO a partir de P<sub>4</sub>, esta alterada en la cepa WKY, utilizando como control a la cepa Wistar.

## **2.9. WKY como modelo animal**

Como ya es sabido, la ansiedad ha sido estudiada extensamente en modelos animales y existen más de treinta utilizados (Becerra-García et al., 2007; Polanco et al., 2011), sin embargo la cepa WKY, se propone como un modelo animal de ansiedad y depresión ya que son ratas hiper-reactivas fisiológica y conductualmente al estrés (Kalueff y Tuohimaa, 2004).

Las ratas WKY surgieron a partir de las Wistar como controles de ratas hipertensas, esta cepa fue generada en 1963 por Okamoto y Aoki. La cepa WKY muestra comportamiento similar a la ansiedad, con mayor secreción de ACTH en respuesta a situaciones de estrés (Cassano y Argibay, 2010; Will et al., 2003;).

En comparación con otras cepas, WKY muestra hormonal, conductual y fisiológicamente signos que emulan a los síntomas encontrados en pacientes depresivos (Will et al., 2003), además la WKY desarrolla un comportamiento anormal de evitación y presentan inhibición conductual, observando una

disminución de la actividad o inactividad en nuevos retos sociales y no sociales, siendo la inhibición conductual un riesgo para los trastornos de ansiedad (Rogel-Salazar y López-Rubalcaba, 2011), por lo que se han propuesto como modelo para estudiar la patología ansiosa. Por otra parte, muestran una desregulación en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) y en el eje HHA, lo que indica una estrecha relación entre la emotividad y el sistema neuroendocrino. Por ejemplo en comparación con la cepa Wistar, la concentración plasmática de la ACTH y de los CORT de la cepa WKY son significativamente más altos durante varias horas del pico diurno (McAuley et al., 2009; Vílchez, 2011; Will et al., 2003). Además esta cepa muestra una disminución en la actividad de campo abierto (CA), prueba de actividad locomotriz y ansiedad en ED. (McAuley et al., 2009; Will et al., 2003).

La clasificación de la ansiedad experimental es tan difícil como la clasificación de la ansiedad humana y trastornos del espectro depresivo, por tanto, para diferenciar entre los mecanismos relacionados con cada una se puede basar en las características mostradas en la Tabla 2 (Kalueff y Tuohimaa, 2005).

**Tabla 2. Principales perfiles de comportamientos en modelos experimentales de ansiedad y depresión (De Boer y Koolhaas, 2003).**

**Perfiles de comportamiento en modelos experimentales de ansiedad y depresión en ratas**

<b>Índices de comportamiento</b>	<b>Ansiedad</b>	<b>Depresión</b>
Locomoción general	+	-*
Exploración	-	-
Acicalamiento	+ (Frecuencia)	+ (Duración)
Inmovilidad	+ (Congelamiento)	+ **
Defecación, micción	+	¿
Agresión	+	+
Auto-agresión	0	+
Evaluación de riesgos	+ 0 - ***	-
Comportamientos de ED	+	0

(+) Aumento, (-) Descenso, (¿) Efectos no claros o inconsistentes, (0) sin efectos, \* mostradas en modelo de brazos abiertos, en modelo de depresión, \*\*En test de nado forzado, \*\*\*Dependiendo del modelo.

Algunos autores han reportado que la ansiedad experimental disminuye durante la fase de proestro y estro, fases caracterizadas por niveles altos de estrógenos (E) y P<sub>4</sub>, comparado con los niveles de hembras OVX o en diestro, por lo que la administración secuencial de E y P<sub>4</sub> produce una respuesta ansiolítica en pruebas conductuales (Fernández-Guasti y Picazo, 1992; Martínez-Mota et al., 2000). Ya es bien sabido que el SPM se presenta en mujeres que presentan de manera normal su menstruación, por lo que los animales evaluados en este proyecto deben ser cíclicos.

## 2.10. Ciclo estral de la rata

El ciclo estral se define como el intervalo de tiempo existente desde el comienzo de un periodo de celo hasta el comienzo del siguiente. El ciclo está condicionado principalmente por la secreción ovárica de dos tipos de hormonas. En el primer estadio el líquido folicular contiene E y en el segundo se forma en el cuerpo lúteo la P<sub>4</sub> (Caravaca et al., 2005).

El ciclo estral de la rata dura aproximadamente 4-5 días y se caracteriza por 4 fases:

**Proestro:** Periodo en el cual se inicia el crecimiento y la maduración de uno o varios folículos ováricos. Conforme los folículos van creciendo van secretando E y van preparando el aparato reproductor para el estro. La mucosa vaginal presenta numerosas mitosis, apareciendo células epiteliales nucleadas; voluminosas; además de escasas células cornificadas de los estratos superiores (Fig. 4). Tiene una duración aproximada de 16 horas (Caravaca et al., 2005; De Costa et al., 1993).

**Estro:** es el periodo de receptividad de la hembra, caracterizado por las manifestaciones conductuales de celo. Es en este momento cuando se produce la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. Tras las numerosas mitosis que presenta la mucosa vaginal, aparecen células epiteliales, con forma poligonal, cornificadas y sin núcleo o con núcleo eosinófilo, además también se pueden

observar escasos leucocitos, muy pocas células epiteliales (Fig. 4). Duración aproximada 20 horas (Caravaca et al., 2005; De Costa et al., 1993).

**Metaestro:** se forma en el ovario el cuerpo lúteo, responsable de la secreción de elevados niveles de  $P_4$ , característica de esta fase. La mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos y también se pueden apreciar células cornificadas que empiezan a degenerar (Fig. 4). Duración de 10 horas (De Costa et al., 1993).

**Diestro:** representa generalmente la fase más larga del ciclo y corresponde con un periodo de inactividad sexual. Si no ha habido fecundación, durante esta fase se produce la regresión del cuerpo lúteo y disminuyen los niveles de E y  $P_4$ . Como consecuencia, el útero se hace pequeño y poco contráctil. La mucosa vaginal es muy delgada y los leucocitos que emigran a través de ella constituyen el frotis vaginal; además pueden observarse escasas células epiteliales nucleadas (Fig. 4). Tiene una duración aproximada de 60 horas (De Costa et al., 1993).

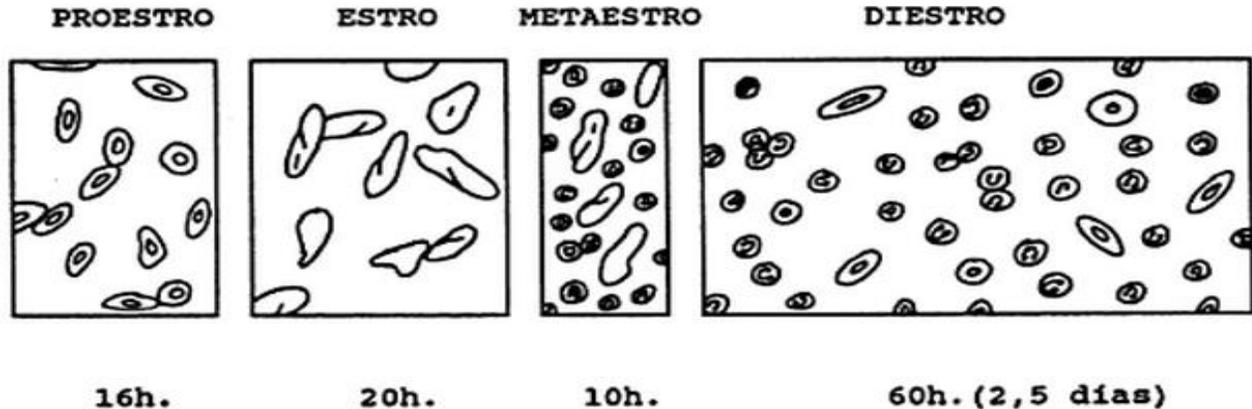


Figura 4.- Fases del ciclo estral de la rata (De Costa et al., 1993).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existen tres etapas endocrinas donde la mujer presenta mayor incidencia de ansiedad, depresión e irritabilidad: periodo premenstrual, postparto y climaterio (Rodríguez-Landa et al., 2009) siendo el SPM una patología con mayor grado de prevalencia en mujeres en edad fértil (75- 95%). Además se ha demostrado que en la mujer la mitad de los accidentes ocurridos en su hogar, trabajo o en su automóvil tiene lugar en la semana premenstrual (Bonilla, 2012).

Durante el SPM existe una disminución de las concentraciones de hormonas ováricas y a nivel cerebral de los neuroesteroides, progesterona ( $P_4$ ) y su metabolito, alopregnanolona (ALLO), lo que se ha asociado al desarrollo de estados ansiosos (Girdler et al., 2001). De hecho una de las alternativas de tratamiento es la administración de  $P_4$ , ya que induce un claro efecto ansiolítico. Con el fin de retirar la fuente secretora de hormonas y para representar el modelo de SPM, se utilizó el modelo animal ovariectomizado (OVX).

Se sabe que el efecto ansiolítico de la progesterona está vinculado a la producción de su metabolito  $5\alpha$ - reducido ( $5\alpha$ -R), ALLO, sin embargo estudios preliminares indican que el efecto ansiolítico de la progesterona no se observa en la cepa Wistar Kyoto (WKY) por lo que es posible que la expresión de la enzima  $5\alpha$ -R sea menor en comparación a la cepa Wistar y por ello, no se lleve a cabo la regulación del eje HHA de manera eficaz.

Dado que la cepa WKY es un modelo animal en donde se expresan conductas ansiosas y depresivas, dos síntomas claves del SPM, y son hiper-reativas al estrés, es de nuestro interés cuantificar la isoenzima  $5\alpha$ -R y niveles de alopregnanolona y corticosterona en respuesta a la administración de progesterona, utilizando como control la cepa Wistar.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si en la cepa Wistar la producción de  $P_4$  disminuye las conductas tipo ansiosas, a través de su metabolito ALLO, entonces la expresión de la enzima  $5\alpha$ -R2 será inversamente proporcional a la expresión de la ansiedad en ratas de la cepa WKY.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. General**

- Evaluar la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R en hipocampo y niveles plasmáticos de CORT y ALLO en respuesta a la progesterona en ratas de la cepa Wistar y Wistar Kyoto sometidas a un modelo de ansiedad experimental.

### **5.2. Particular**

- Analizar el efecto de diferentes dosis de progesterona sobre la conducta ansiosa en ratas hembra Wistar y WKY, SHAM y OVX sometidas a ED.
- Evaluar los niveles plasmáticos de ALLO y CORT en respuesta a una dosis de progesterona en ratas hembra Wistar y WKY, SHAM y OVX sometidas a ED.
- Cuantificar la expresión del RNAm de la enzima 5 $\alpha$ -R2 en respuesta a una dosis de progesterona en el Hipocampo en ratas hembra Wistar y WKY, SHAM y OVX sometidas a ED.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. Animales**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar y WKY de 3 meses con un peso superior a 200gr sometidas a un ciclo invertido de 12h luz/ 12h oscuridad, a temperatura ambiente (22°C), con acceso libre de agua y alimento. Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y aprobadas por el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”.

### **6.2. Ovariectomía (OVX) y falsa cirugía (SHAM).**

Las ratas fueron anestesiadas con tribromoetanol (2%; 10 ml/kg i.p.). Se realizó un pequeño corte longitudinal en la parte ventral del animal, los ovarios fueron expuestos y removidos junto con los oviductos, con el fin de retirar la fuente secretora de hormonas, para finalizar se suturó músculo y piel de la rata desinfectando la zona de incisión con solución antiséptica. Para la falsa cirugía (SHAM), se realizó el mismo procedimiento pero sólo se manipularon los oviductos y ovarios sin retirarlos. Una vez realizada la cirugía se dejaron en reposo por 3 semanas antes de ser sometidos a la prueba conductual de ansiedad (ED).

Se formaron de manera aleatoria dos grupos por cepa, OVX y SHAM, los cuales fueron sometidos a ED. A su vez estos grupos se subdividieron en tratados con vehículo (VEH; Aceite de maíz; 0.2mL/rata, s.c.) o con P<sub>4</sub> (Sigma; 0.25, 0.5 o 1.0 mg/Kg; 0.2mL/ rata, s.c), en una sola dosis (Diagrama 1). 40 minutos después a la administración respectiva los animales fueron sometidos al modelo conductual (ED), más tarde los animales fueron sacrificados por decapitación para así obtener muestras sanguíneas del tronco para medir las

concentraciones plasmáticas de CORT y ALLO, por medio de la prueba ELISA y se colecto el tejido cerebral (hipocampo) para cuantificar la enzima 5 $\alpha$ -R2, por medio de la técnica PCR.

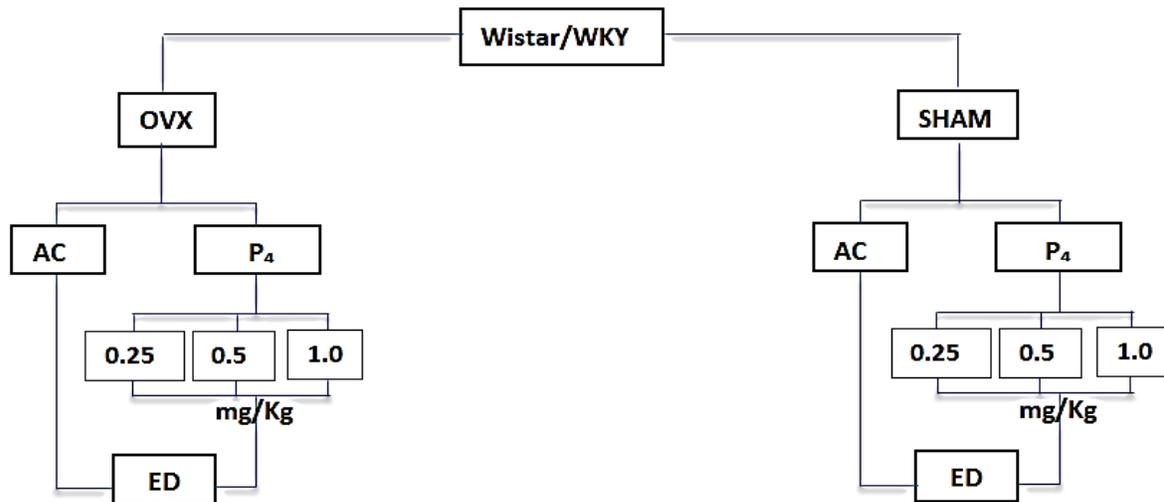


Diagrama 1. Diseño experimental de grupos a tratar.

### 6.3. Ciclo estral

Todos los animales SHAM fueron monitoreados, con el objetivo de verificar un ciclo normal. Las ratas OVX fueron manipuladas de la misma manera que las SHAM, con el fin de que ambos animales SHAM y OVX recibieran la misma manipulación.

El ciclo estral fue evaluado por medio de un frotis vaginal tomado diariamente por 15 días con una pipeta Pasteur de polietileno (Corning,USA) y colocando la muestra en un porta objetos (Corning, USA), las muestras fueron observadas en fresco en un microscopio óptico compuesto (Vanguard, USA) y se registró la fase estral de acuerdo a Caravaca et al (2005) y De costa et al (1993).

## **6.4. Enterramiento Defensivo (ED)**

El procedimiento general de la prueba de enterramiento defensivo descrita por Pinel y Treit (1978) consiste en colocar a la rata en un una caja de acrílico (34x16x24cm) con la base cubierta de aserrín y un electrodo de 7cm insertado en una de las paredes, 2 cm por encima de la base. El electrodo está conectado a una fuente generadora de corriente alterna que permite que cada vez que el animal toque el electrodo reciba una descarga eléctrica (0.3 mA). La intensidad de este choque no genera daño físico al animal pero es identificado como un estímulo aversivo (De Boer y Koolhaas, 2003; Sollozo et al., 2011).

Para disminuir el impacto de someter al animal a un ambiente novedoso, las ratas se colocaron en la caja donde se realizó la prueba conductual, sin el estímulo electrificado durante 10 minutos por 3 días consecutivos antes de realizar la prueba.

Posteriormente el comportamiento del animal fue observado y grabado por un periodo de 10 minutos, para posteriormente evaluar la respuesta conductual. Para esto, se cuantificaron los comportamientos característicos de ED, previamente descritos como son, erguimiento o levantamiento, inmovilidad, freezing, acicalamiento, exploración del electrodo, además también se observó y registró, latencia de enterramiento, tiempo acumulativo de enterramiento y número de choques recibidos.

## **6.5. Campo Abierto (CA)**

Este modelo se utilizó con el fin de descartar alguna alteración motora, inducida por la manipulación hormonal, que pudiera afectar el desempeño de los animales durante la prueba de ED. Esta prueba fue realizada después de la prueba de ED.

Este procedimiento constó de una caja de plexiglas opaca (40x30x20 cm.) con el piso dividido en 12 cuadros de 11x11 cm. El animal fue colocado individualmente en una esquina de la caja y durante 5 minutos se cuantificó el número de veces que el sujeto cruzó con las cuatro patas de un cuadro a otro.

Sesenta minutos más tarde, los animales fueron sacrificados por decapitación y se colectó la sangre para la evaluación de los niveles plasmáticos de CORT y ALLO. Así mismo, se extrajo el cerebro para obtener el hipocampo y evaluar la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R.

## **6.6. Reacción de la transcriptasa reversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

RT-PCR es una variante de la PCR convencional donde se utiliza RNA como molde para sintetizar ADN complementario (cDNA; Por sus siglas en inglés; Díaz-Alonso et al., 2013).

Los cerebros fueron extraídos y almacenados a -20 °C hasta ser seccionados. Se realizó el corte frontal de hipocampo de aproximadamente 0.2 mm, con una navaja para disección, para verificar la zona a seccionar se tomó como referencia el cerebelo y basándonos con el Atlas estereotáxico del cerebro de rata, según Paxinos G. y Watson C. (2005; Anexo I, de Bregma -2.40 mm a Bregma -4.68 mm). Posteriormente se procedió a la extracción de RNA total del tejido de hipocampo de la rata, para determinar la expresión del RNAm de la 5 $\alpha$ -R2, de acuerdo al método del ácido guanidina-fenol-cloroformo (AGPC) descrito por Chomczynsky y Sacchi (1986). Una vez hecha la extracción, se realizó la dilución y lectura de RNA, comparando con un blanco (2  $\mu$ L de DEPC en 98  $\mu$ L de agua Milli Q). La medida de absorbancia se realizó en cubetas de cuarzo, tomando el valor de  $A_{260}$ . Posteriormente, se procedió a

preparar alícuotas con una concentración de 1.5µg de RNA en 12µL de DEPC, de los cuales se tomó una alícuota de 4µL para realizar integridad y una alícuota de 8µL para la transcripción.

Se tomó la alícuota de 4µL de cada muestra y se comprobó la integridad del RNA, la cual se analizó mediante electroforesis vertical en gel de agarosa al 2% utilizando como control el marcador molecular VIII (320pb); Este procedimiento permite un chequeo rápido y eficiente de la calidad de muestras de RNA total. Posteriormente, el gel se reveló con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia. Las bandas se visualizaron en un transluminador UV (Bio-Rad, USA) y los geles fueron capturados mediante una cámara fotográfica (Bio-Rad, USA).

Para poder realizar la transcripción de RNA a cDNA se tomaron las alícuotas de 8 µL y se procedió a la inactivación, con el fin de desmontar la estructura secundaria del RNA , en termociclador (Eppendorf, USA) a 65 °C por 5 min, se colocaron en hielo y se le adicionó una mezcla de agua destilada libre de RNAsas, buffer RT 5X (Tris-HCl 250 nM; KCl 375 nM, MgCl<sub>2</sub> 15 nM), ditioneitol (DTT, 0.1M 10X), dNTPs 10 nM, oligodT y transcriptasa reversa (M-MLV RT). Se incubaron durante 2 h a 37 °C. Al término de la incubación se tomaron 4 µl de la mezcla de reacción de cDNA y se le adicionó a la mezcla de PCR por cada tubo, agua destilada libre de RNAsas, buffer Taq DNA polimerasa 10X, dNTPs 10 nM, oligonucleótido correspondiente sentido y antisentido, MgCl (1.5 mM) y Amplificasa (Biogénica). Los tubos se colocaron en el termociclador (Eppendorf). Los ciclos y las condiciones de incubación se seleccionaron dependiendo de las características de cada oligo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Ciclos y condiciones de 5 $\alpha$ -R2 y Cyclofilina

	<b>pb</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>5<math>\alpha</math>-R2</b>	180 pb	64	19
<b>Cyclofilina</b> (control endógeno)	259 pb	64	28

Las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis vertical en una cámara de electroforesis (Eppendorf, USA), en agarosa (2%) por 60 min. Posteriormente el gel fue revelado mediante la adición de bromuro de etidio, el cual intercaló los fragmentos de ADN, finalmente se colocó en un transluminador (Bio-Rad, USA) y fueron capturados mediante una cámara fotográfica (Bio-Rad, USA). Las bandas fueron separadas con base a su tamaño en pares de base (pb) y los fragmentos obtenidos de la PCR fueron analizados con el programa “Advanced American Biotech Imaging 2D” (Advanced American Biotechnology; CA, EUA).

## **6.7. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)**

Se colectó 5 ml de sangre del tronco en tubos eppendorf (axigen, USA) para centrífuga y se mantuvieron en hielo hasta centrifugarlas a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C, para permitir la extracción del plasma, mismo que se separó y almacenó a -20°C hasta el momento de su análisis hormonal (ELISA). Los niveles de CORT y ALLO fueron determinados tomando todos los cuidados necesarios para prevenir la degradación y usando el kit de inmunoensayo (Arbor assays, USA) de acuerdo a los materiales y protocolos señalados por el proveedor. La placa fue leída a 405 nm para CORT y 450 nm para ALLO en un lector de ELISA (Bio -Tek, USA). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo para CORT fueron de 8.4 % y 8.2 %, respectivamente y la sensibilidad

de 26.99 pg/mL. Para ALLO de 5.0 % y 8.4%, respectivamente y la sensibilidad fue de 130 pg/mL.

## **6.8. Análisis Estadístico**

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media. Para el análisis de los datos conductuales y niveles hormonales de CORT / ALLO se utilizó la prueba estadística ANOVA dos vías, seguido de una prueba post hoc (Shapiro -Wilk). Para ANOVA de dos vías se tomó como factor A la condición y factor B: tratamiento. El valor de significancia estadística a considerar fue de  $p < 0.05$ .

## **7. RESULTADOS**

Efecto de la administración de P<sub>4</sub> en ratas de la cepa Wistar y WKY sobre la conducta tipo ansiosa en el modelo de Enterramiento Defensivo.

### **7.1. Efecto de la progesterona sobre la ansiedad experimental**

#### **7.1.1 Wistar**

##### **7.1.1.1 Conductas activas**

###### **Tiempo acumulativo de enterramiento y acicalamiento**

En la Figura 5, se observa el efecto de diferentes dosis de progesterona (0, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/Kg) sobre las conductas activas que expresan ansiedad en el modelo de ED. La dosis de 1.0 mg/kg de progesterona redujo significativamente el tiempo acumulativo de enterramiento en las ratas OVX en comparación al grupo tratado con VEH ( $p < 0.005$ ) y contra el grupo tratado con la dosis de 0.5 mg/kg ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas en los grupos SHAM con ninguna de las dosis probadas. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por tratamiento  $F(3,38) = 5.59$ ,  $p = 0.003$ ; por condición  $F(1,38) = 0.86$ , ns; la interacción tratamiento X condición  $F(3,38) = 0.25$ , ns.

Por otra parte, la progesterona no modificó de manera significativa la conducta de acicalamiento a las dosis ensayadas ni en las hembras OVX o SHAM. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por tratamiento  $F(3,38) = 2.64$ , ns; por condición  $F(1,38) = 1.93$ , ns; y la interacción tratamiento X interacción  $F(3,38) = 2.11$ , ns

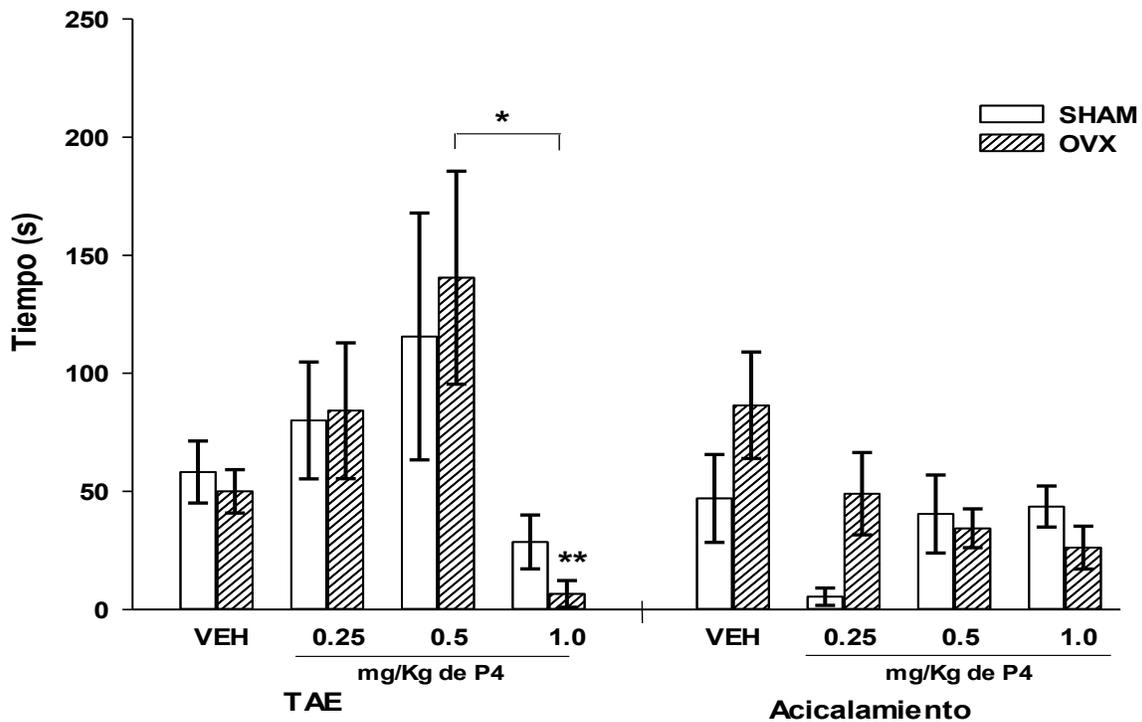


Fig.5 Efecto de  $P_4$  sobre las conductas de enterramiento y acicalamiento en el modelo de enterramiento defensivo en la cepa Wistar. Los datos se expresan como la media  $\pm$  E.E de la media. VEH=Vehículo; TAE=Tiempo Acumulativo de Enterramiento.  $n=7$  por grupo. \* $p<0.05$  vs 0.5 mg/Kg de  $P_4$ ; \*\* $p<0.003$  vs VEH

### 1.1.2 Suma de conductas pasivas Congelamiento e inmovilidad

En la Figura 6 se muestra el efecto de las diferentes dosis de  $P_4$  sobre la suma del tiempo total invertido en la expresión de conductas tipo ansiedad pasiva mostrada en el modelo de ED. Se puede observar que tanto en hembras SHAM como en OVX la  $P_4$  no modificó de manera significativa las conductas pasivas. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores por tratamiento  $F(3,84)=1.24$ , ns; por condición  $F(1,84)=1.87$ , ns; y la interacción tratamiento X interacción  $F(3,84)=0.83$ , ns.

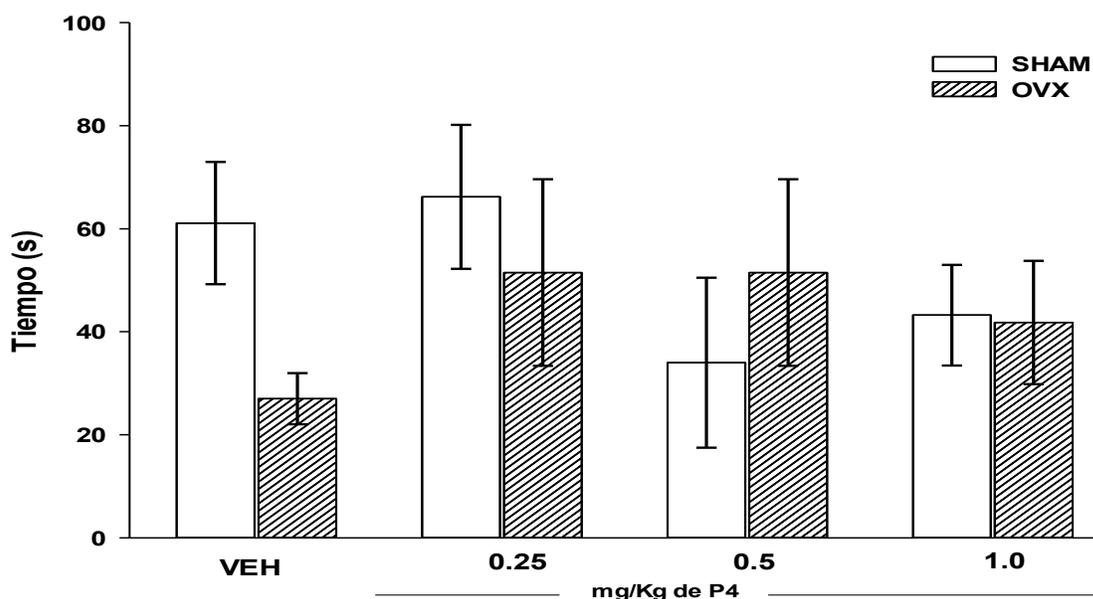


Fig.6 Efecto de la P<sub>4</sub> sobre la suma de conductas pasivas (congelamiento e inmovilidad) en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa Wistar. Los datos se expresan como la media ± E.E. VEH=Vehículo. n= 7 por grupo.

Por otra parte como se puede observar en la tabla 4, en animales SHAM ni en OVX la P<sub>4</sub> no ejerció efecto sobre otras variables conductuales medidas en el ED (erguimiento, exploración al electrodo, número de choques recibidos).

**Tabla 4.** Efecto de la P<sub>4</sub> sobre el erguimiento, exploración al electrodo y número de choques recibidos en el modelo de campo abierto en la cepa Wistar

	VEH	0.25mg/Kg	0.5 mg/Kg	1.0 mg/Kg
<b>Erguimiento (Segundos)</b>				
SHAM	14± 2.80	8± 1.06	11± 2.84	14± 2.53
OVX	12± 2.81	14± 2.78	15± 2.93	7± 4.50
<b>Exploración al electrodo (Segundos)</b>				
SHAM	15± 2.76	11± 2.02	15± 2.71	13± 1.87
OVX	10± 1.85	11± 2.20	13± 3.64	11± 2.35
<b>Número de Choques recibidos (Frecuencia)</b>				
SHAM	4± 0.97	5± 0.94	5± 1.23	5± 1.32
OVX	2± 0.21	2± 0.29	4± 0.63	4± 0.34

Los datos se expresan como la media ± E.E de la media de 7 animales por grupo

## 7.1.2 WKY

Para la evaluación de conductas ansiosas en ratas vulnerables a estrés sometidas a diferentes dosis de P<sub>4</sub>, se utilizó la cepa WKY como modelo animal.

### 7.1.2.1 Conductas Activas

#### Tiempo acumulativo de enterramiento y acicalamiento

No se observaron diferencias significativas en los grupos con ninguna de las dosis probadas. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por tratamiento F (3,41)=3.85, ns; por condición F (1,41)=1.74, ns; y la interacción condición X tratamiento F (3,41)=1.15, ns (Figura 7).

Así mismo, la progesterona no modificó de manera significativa la conducta de acicalamiento con las dosis probadas ni en las hembras OVX o SHAM. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por tratamiento F (3,41)=0.25, ns; por condición F (1,41)= 0.14, ns; y la interacción condición X tratamiento F (3,41)= 0.16, ns.

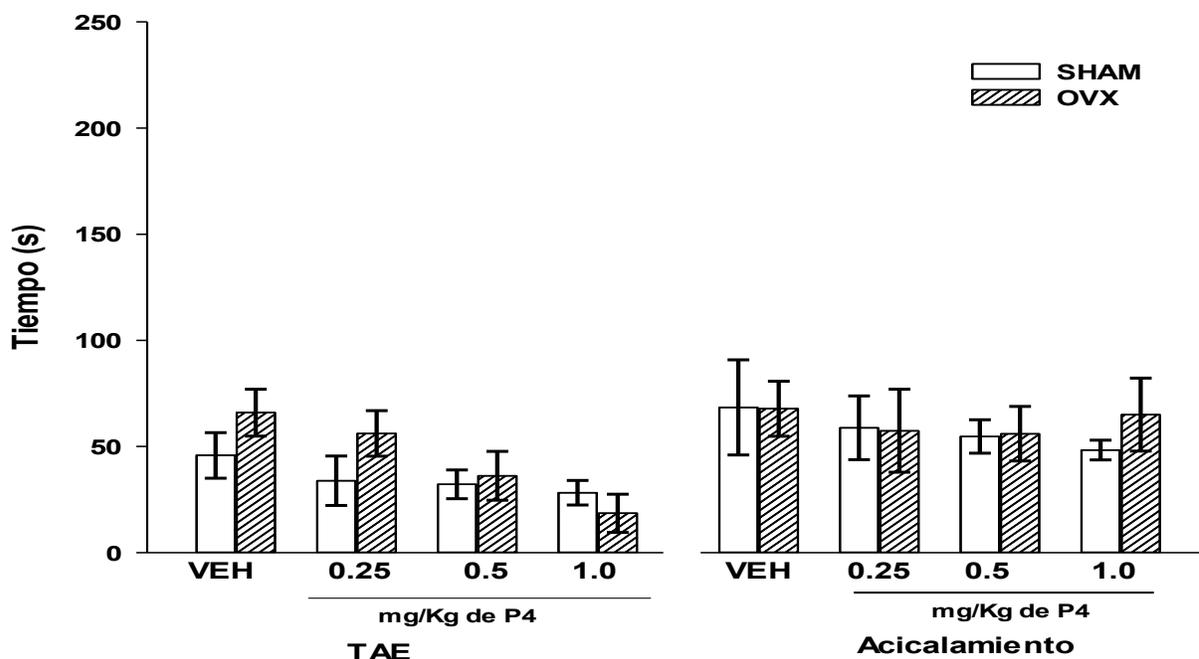


Fig. 7 Efecto de P<sub>4</sub> sobre las conductas de enterramiento y acicalamiento en el modelo de enterramiento defensivo en la cepa WKY. Los datos se expresan como la media ± E.E de la media. VEH=Vehículo; TAE=Tiempo Acumulativo de Enterramiento. n= 7 por grupo.

### 7.1.2.2 Suma de conductas pasivas Congelamiento e inmovilidad

En la Figura 8 se puede observar el efecto de las diferentes dosis de P<sub>4</sub> sobre la suma del tiempo total invertido en la expresión de conductas pasivas en el modelo de ED. Las dosis de P<sub>4</sub> probadas no modificaron de manera significativa las conductas pasivas que expresan ansiedad ni en hembras SHAM ni OVX. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por tratamiento F (3,90)=1.68, ns; por condición F (1,90)= 0.66, ns; y la interacción de condición X tratamiento F (3,90)=0.30, ns.

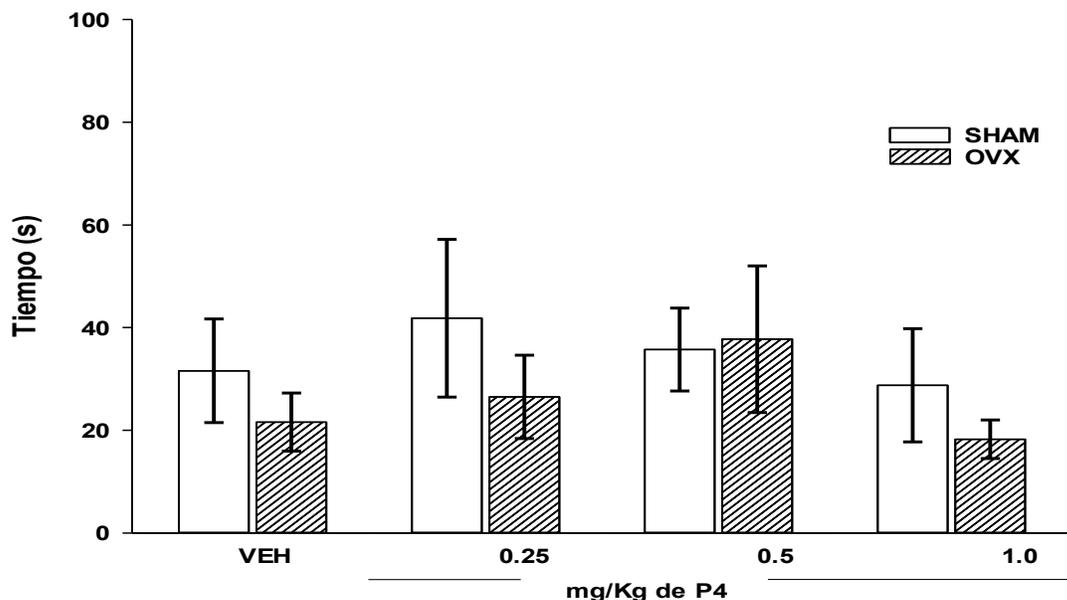


Fig. 8 Efecto de la P<sub>4</sub> sobre la suma de conductas pasivas (congelamiento e inmovilidad) en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa WKY. Los datos se expresan como la media  $\pm$  E.E. VEH=Vehículo. n= 7 por grupo.

A semejanza de la cepa Wistar, la P<sub>4</sub> no ejerció efecto en la cepa WKY sobre el resto de las conductas evaluadas en ED (erguimiento, exploración al electrodo, número de choques recibidos) entre los diferentes grupos y tratamientos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto de la P<sub>4</sub> sobre la conducta de Erguimiento, Exploración al electrodo, número de choques recibidos en el modelo de ED en la cepa WKY

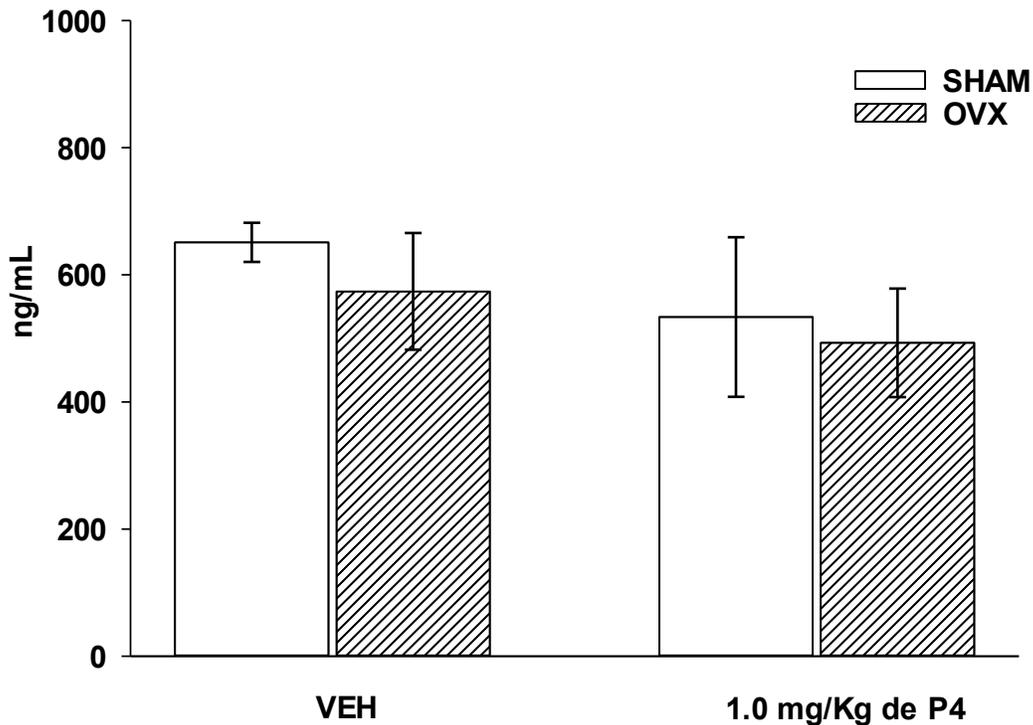
	VEH	0.25mg/Kg	0.5 mg/Kg	1.0 mg/Kg
<b>Erguimiento (segundos)</b>				
SHAM	11± 2.56	10± 2.87	12± 2.36	7± 2.54
OVX	9± 2.39	11± 3.22	10± 2.98	10± 2.87
<b>Exploración al electrodo (segundos)</b>				
SHAM	12± 2.56	14± 3.63	14± 2.80	13± 2.65
OVX	12± 2.98	11± 2.61	14± 2.56	11± 2.54
<b>Número de Choques recibidos (frecuencia)</b>				
SHAM	2± 0.95	2± 0.23	2± 0.63	2± 0.94
OVX	2± 0.56	3± 0.66	2± 0.38	7± 0.64

Los datos se expresan como la media ± E.E de la media de 7 animales por grupo

## 7.2. Efecto de la progesterona sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona

### 7.2.1 Wistar

Debido a que la dosis de P<sub>4</sub> de 1 mg/kg fue la única que modificó las conductas que reflejan ansiedad en el ED, sólo se analizó el efecto de esta dosis sobre los niveles plasmáticos de CORT. En la Figura 9 se observa el efecto de la dosis 1.0 mg/kg de P<sub>4</sub> sobre los niveles de CORT, en hembras sometidas a la prueba de ED. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas, ni por tratamiento, ni condición (OVX versus SHAM). La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por condición  $F(1,15)=0.46$ , ns; por tratamiento  $F(1,15)=1.32$ , ns.



**Fig.9 Efecto de 1.0 mg/Kg de P<sub>4</sub> sobre los niveles de corticosterona en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa Wistar. Los datos se expresan como la media ± E.E. VEH=Vehículo. n= 5 por grupo.**

### 7. 2.2 WKY

En la Figura 10 se muestra el efecto de la dosis de 1.0 mg/kg de P<sub>4</sub> sobre los niveles de CORT en la cepa WKY sometidas a la prueba de ED. La P<sub>4</sub> redujo significativamente los niveles de CORT en ratas OVX en comparación con las SHAM (p<0.02). La ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores: por condición F (1,15)=4.47, p=0.05; por tratamiento F (1,15)=0.01, ns y condición X tratamiento F (1,15)=1.67, ns.

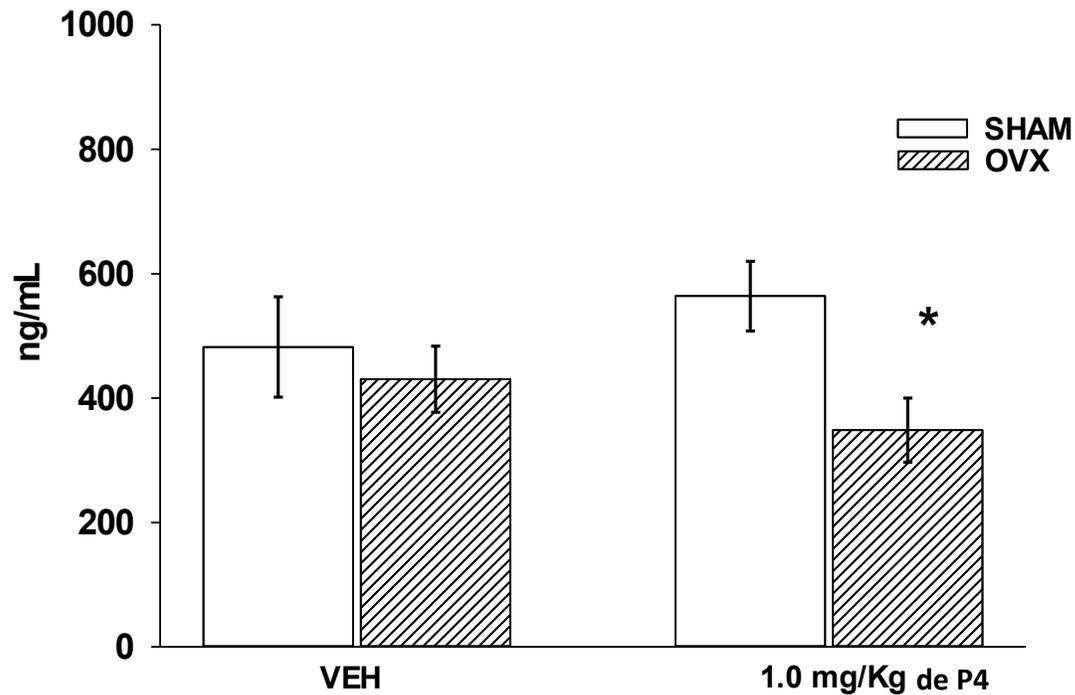


Fig. 10 Efecto de 1.0 mg/Kg de P<sub>4</sub> sobre los niveles de corticosterona en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa WKY. Los datos se expresan como la media ± E.E. VEH=Vehículo; ED=Enterramiento Defensivo. n= 5 por grupo.\*p<0.05 vs SHAM.

### 7.3. Efecto de la progesterona sobre las concentraciones plasmáticas de alopregnanolona

#### 7.3.1 Wistar

La progesterona se metaboliza a alopregnanolona y es éste producto el que produce los efectos ansiolíticos previamente mencionados (Sánchez, 2007). Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2 que interviene en la conversión de P<sub>4</sub> a ALLO y los niveles plasmáticos de dicha hormona.

En la Figura 11, se observa el efecto de 1.0 mg/kg de P<sub>4</sub> sobre los niveles plasmáticos de ALLO en animales SHAM y OVX. La dosis de 1.0 mg/kg de P<sub>4</sub>

redujo significativamente la concentración de ALLO en las ratas OVX en comparación a las SHAM ( $p < 0.05$ ) y contra el grupo OVX tratado con VEH ( $p < 0.05$ ). La ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas por condición  $F(1,11) = 5.36$ ,  $p = 0.04$ , por tratamiento  $F(1,11) = 0.94$  ns, y condición X tratamiento  $F(1,11) = 1.33$ , ns.

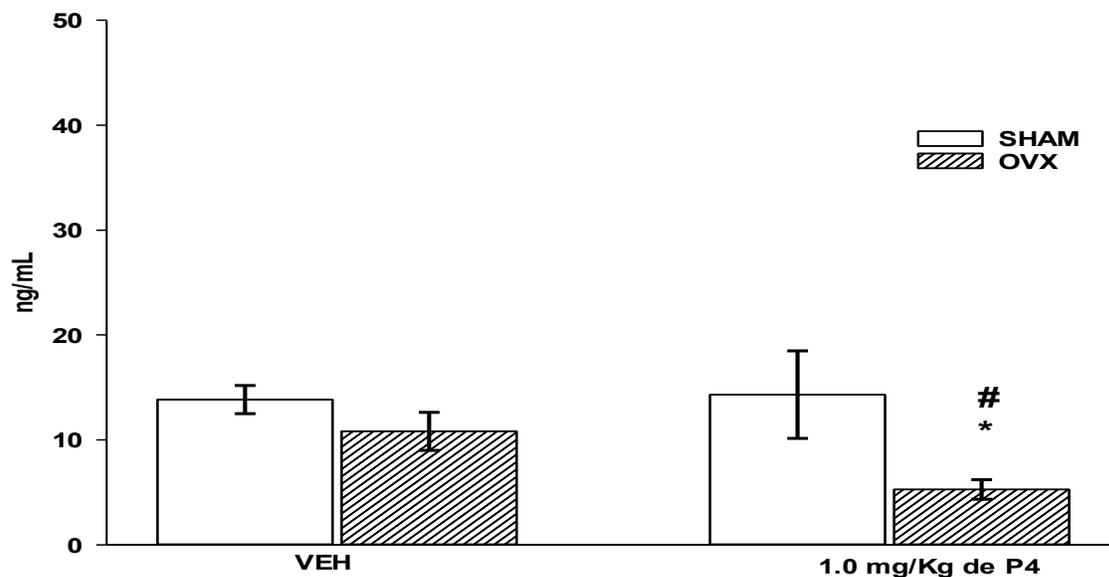


Fig.11 Efecto de 1.0 mg/Kg de  $P_4$  sobre los niveles de alopregnanolona en el modelo de Enterramiento Defensivo registradas en la cepa Wistar. Los datos se expresan como la media  $\pm$  E.E. VEH= Vehículo;  $n = 4$  por grupo.

\* $p < 0.05$  vs SHAM; #  $p < 0.05$  vs VEH

### 7.3.2 WKY

En la Figura 12, se observa el efecto de la  $P_4$  sobre los niveles de ALLO en animales sometidos al modelo de ED. La  $P_4$  no modificó de manera significativa los niveles de ALLO ni por la condición, ni por tratamiento. La ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores: por condición  $F(1,18) = 1.84$ , ns y por tratamiento  $F(1,18) = 0.70$ , ns y la interacción condición X tratamiento  $F(1,18) = 1.066$ , ns,

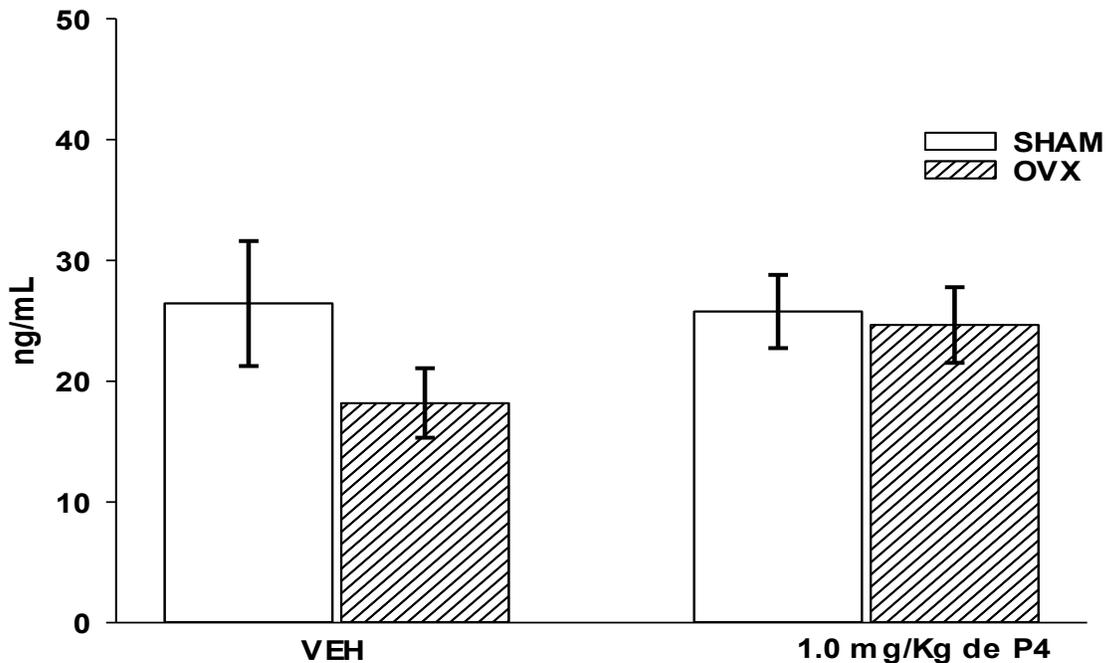


Fig.12 Efecto de 1.0 mg/Kg de P<sub>4</sub> sobre los niveles de alopregnanolona en plasma en la cepa Wistar Kyoto. Los datos se expresan en nanogramos por mililitro como la media ± E.E. VEH= Vehículo. n= 7 por grupo.

## 7.4. Efecto de la progesterona sobre la expresión de la enzima 5α-R2

### 7.4.1 Wistar

Para el análisis de la expresión de la enzima 5α-R2 se realizó la técnica de RT-PCR. En la Figura 13, se observa el efecto de la P<sub>4</sub>, sobre la expresión de 5α-R2 en hipocampo, en hembras SHAM y OVX sometidas a la prueba de ED. La OVX aumentó significativamente la expresión de la 5α-R2 en comparación a las ratas SHAM (p<0.05). De manera similar, la dosis de 1.0 mg/kg de P<sub>4</sub> aumentó la expresión de la enzima en el grupo sometido a OVX en contraste con las SHAM (p<0.05), este aumento fue el doble al observado en los animales OVX tratados con VEH (p<0.05). Más aún, en animales SHAM tratados con P<sub>4</sub> se observó un incremento en la expresión de la enzima 5α-R2 en comparación al grupo SHAM tratado con VEH (p=0.05). La ANOVA de dos vías mostró diferencias

significativas en el factor condición  $F(1,11)=34.7$ ,  $p<0.001$ ; tratamiento  $F(1,11)=39.5$ ,  $p<0.001$ ; sin que resultase significativa la interacción.

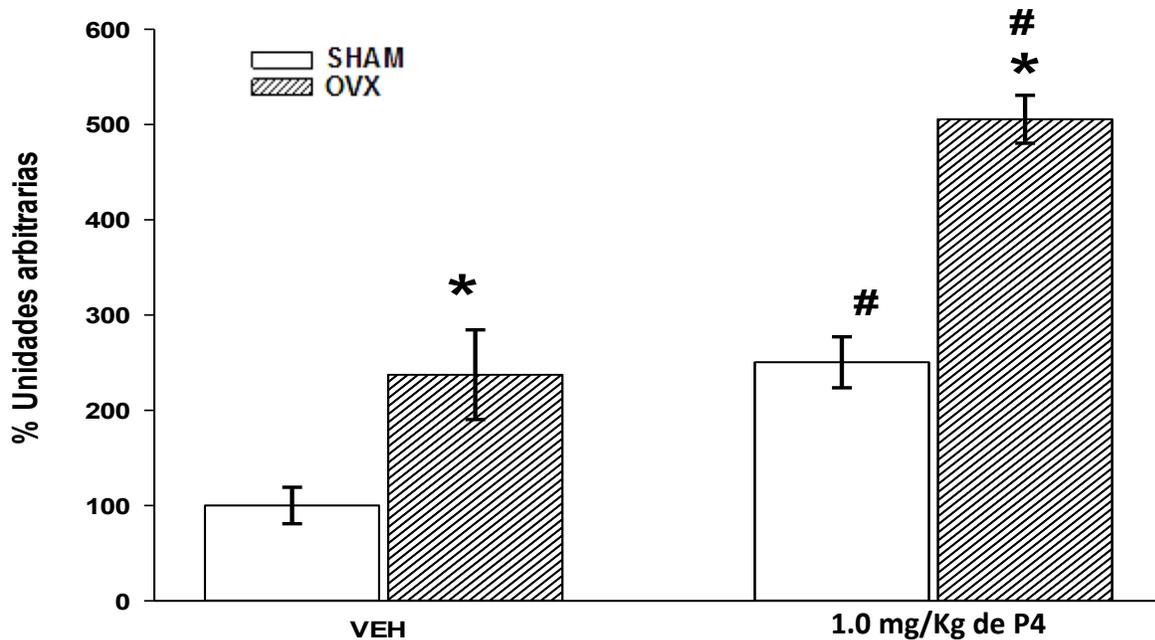


Fig. 13 Efecto de la  $P_4$  sobre la expresión de  $5\alpha$ -R2 en hipocampo sometidas a enterramiento defensivo, expresadas en porcentaje. VEH= Vehículo.  $n=4$  por grupo. \* $p<0.05$  vs SHAM; # $p<0.05$  vs VEH.

#### 7.4.2 WKY

En la Figura 14 se observa el efecto de la  $P_4$  sobre la expresión de la enzima  $5\alpha$ -R2 en hipocampo de hembras sometidas a ED. A diferencia de la cepa Wistar donde la  $5\alpha$ -R2 es modulada por el estrés y la  $P_4$ , la cepa WKY no responde a la prueba de ED con la expresión de la enzima. Más aun, la  $P_4$  no modificó de manera significativa la expresión de  $5\alpha$ -R2 ni en animales OVX o SHAM. La ANOVA de dos vías arrojó los siguientes valores: por condición  $F(1,11)=3.11$ , ns; por tratamiento  $F(1,11) = 10.11$ ,  $p=0.009$ ; y la interacción condición X tratamiento  $F(1,11)=8.38$ , ns.

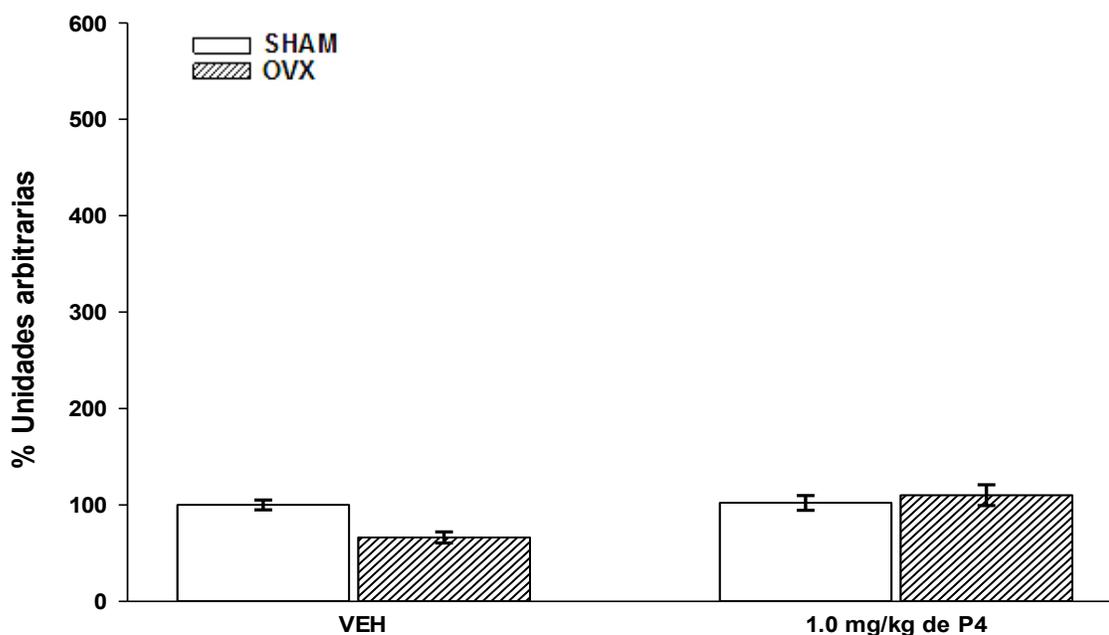


Fig.14 Efecto de la P<sub>4</sub> sobre la expresión de 5α-R2 en hipocampo de ratas WKY sometidas a Enterramiento Defensivo, en porcentaje de unidades arbitrarias. VEH= Vehículo. n=4 por grupo.

## 7.5. Campo Abierto

### 7.5.1 Wistar

El modelo de CA se registró para descartar alguna alteración locomotriz en los animales como consecuencia del tratamiento o la manipulación (OVX versus SHAM). Como puede observarse en la tabla 6, no se encontraron diferencias en el número de cuadros cruzados entre los animales SHAM y los OVX o por el tratamiento con P<sub>4</sub>.

**Tabla 6.** Efecto de la P<sub>4</sub> sobre el número de cuadros cruzados en el modelo de campo abierto en la cepa Wistar

CA	VEH	0.25mg/kg	0.5 mg/kg	1.0 mg/kg
SHAM	38±4.73	34±4.12	35±3.97	33±3.93
OVX	38±7.81	37±7.09	41±6.63	41±4.85

Los datos se expresan como la media ± E.E de la media de 7 animales por grupo. CA= campo abierto; VEH=vehículo; OVX=Ovariectomía.

## 5.2 WKY

Al igual que la cepa Wistar, en la WKY no se observaron diferencias en el número de cuadros cruzados entre los animales Sham y los OVX ni por el tratamiento con diferentes dosis de progesterona (tabla 7).

**Tabla 7.** Efecto de la P<sub>4</sub> sobre el número de cuadros cruzados en el modelo de campo abierto en la cepa WKY

CA	VEH	0.25mg/kg	0.5 mg/kg	1.0 mg/kg
SHAM	24± 3.94	24± 3.56	24± 4.19	25± 4.76
OVX	26± 3.90	28± 3.63	27± 4.98	28± 4.02

Los datos se expresan como la media ± E.E de la media de 7 animales por grupo. CA= campo abierto; VEH=vehículo; OVX=Ovariectomía

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Efecto de la Progesterona sobre la ansiedad experimental

Los resultados del presente estudio demostraron que el efecto ansiolítico de la progesterona depende de la cepa. Este es el primer estudio en el que se compara el efecto de esta hormona y se muestra que el efecto ansiolítico es dependiente de la cepa evaluada.

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la P<sub>4</sub> sobre un repertorio conductual más amplio en la prueba de enterramiento defensivo. Algunos autores consideran que además de la conducta de enterramiento, el acicalamiento dirigido a una parte específica del cuerpo o sin el patrón céfalo caudal típico de los animales (Kalueff y Tuohimaa, 2005), es una conducta activa que sirve de indicativo de los niveles de ansiedad del roedor (Rogel-Salazar y López Ruvalcaba, 2011). La cepa Wistar invirtió poco tiempo en la conducta de acicalamiento y no fue modificado por ninguna de las dosis de progesterona, lo que coincide con lo reportado por Contreras et al (2011) y otros autores (Contreras et al., 2011; Fernández-Guastí y Picazo, 1992; Martínez Mota et al., 2000). Más aún, nuestros datos sugieren que en esta cepa la ansiedad se manifiesta básicamente a través de la conducta de enterramiento, siendo esta conducta el reflejo directo de la ansiedad del animal, así a mayor tiempo de enterramiento, mayor ansiedad (De Boer y Koolhaas, 2003; Martínez-Mota et al., 2000; Pinel y Treit 1978;).

En contraste a la cepa Wistar, la WKY, es una cepa que tradicionalmente muestra la ansiedad a través de conductas pasivas (Pare, 1992; Redei et al., 2001; Will et al., 2003; McAuley et al., 2009) en vez de las activas, por ello se evaluó en este estudio tanto las conductas activas como las pasivas. Más aún, en otros modelos como el FST (por sus siglas en inglés Forced Swimming Test; modelo para evaluar depresión) se reporta que la cepa WKY muestra bajos niveles de conductas activas (escalamiento y nado), y altos niveles de conductas pasivas (inmovilidad; Lahmame et al., 1997). Esto

sugiere que la cepa WKY muestra principalmente conductas tipo ansiosa o depresiva a través de conductas pasivas.

La cepa WKY no respondió a ninguna de las dosis probadas de P<sub>4</sub> ya que no se observaron cambios significativos tanto en las conductas activas como las pasivas, por lo que se puede sugerir que no responde al efecto ansiolítico de la P<sub>4</sub> a las dosis evaluadas. A diferencia de la cepa Wistar, la WKY es una cepa hiper-reactiva al estrés, ya que algunos reportes (Braw et al., 2006) indican que tienen niveles altos de CORT aun sin ser sometidas a estímulos estresantes, y responden conductualmente de manera exagerada. Es posible que estas diferencias sean ocasionadas por alguna alteración en la regulación del eje adrenal. Se ha propuesto que uno de los factores hormonales que inhibe al eje HHA es la ALLO, que esta a su vez depende de progesterona, lo que permite sugerir que posiblemente la P<sub>4</sub> no se esté convirtiendo a ALLO y por tanto no se facilite dicho efecto ansiolítico.

## **8.2. Efecto de la progesterona sobre los niveles plasmáticos de corticosterona**

Se ha reportado que en mujeres saludables la respuesta a factores estresantes, incrementa los niveles plasmáticos de cortisol, vasopresina (VP) y ACTH, mientras que en mujeres con SPM, esta respuesta no se presenta (Díaz-Burke et al., 2010; Estrada-Camarena et al., 2011). Por lo que se cree que el funcionamiento del eje HHA está alterado. Se propone que los niveles altos de CORT promueven el aumento de la concentración de neuroesteroides intracerebrales, posiblemente como un mecanismo protector (Rapkin, 2009; Estrada-Camarena et al., 2011). Entonces, es de esperar que con el aumento de CORT se presente también la elevación de neuroesteroides en plasma y cerebro y que estos ejerzan sus acciones protectoras ante el estrés (Estrada-Camarena et al., 2011; Rapkin, 2009). Dado que la P<sub>4</sub> se metaboliza a ALLO, se espera entonces que se establezca el efecto ansiolítico y disminuya los niveles de CORT.

En este estudio se encontró que en la cepa Wistar la P<sub>4</sub> no modificó los niveles plasmáticos de CORT ni por condición, ni por el tratamiento, a pesar de ver el efecto ansiolítico en conductas activas. Algunos reportes indican que animales macho sometidos a estrés agudo muestran un incremento en los niveles plasmáticos de CORT, P<sub>4</sub> y ALLO a los 30 min posteriores al estrés, efecto que desaparece a los 60 min (Barbaccia et al., 1996). En este estudio la medición de CORT se realizó 60 min después de la administración de P<sub>4</sub>, por lo que es posible que no se detectaran cambios en niveles plasmáticos de CORT.

En la cepa WKY la P<sub>4</sub> redujo los niveles de CORT en animales OVX, en comparación a los animales SHAM. Estos datos sugieren que la sola OVX está modificando la sensibilidad al efecto de la P<sub>4</sub> sobre los niveles plasmáticos de CORT.

### **8.3. Efecto de la progesterona sobre los niveles plasmáticos de alopregnanolona**

Indusekhar et al (2006) ha reportado niveles bajos de ALLO en mujeres con SPM, por lo que la administración de P<sub>4</sub> favorecería la reducción de los síntomas premenstruales. Evidencia preclínica, muestra que la administración de P<sub>4</sub> o ALLO reduce la conducta tipo ansiosa en el modelo de ED y laberinto elevado en cruz (LEC) en roedores (Gutiérrez-García et al., 2000; Britan et al 1991; Britan et al 1993; Riveros-Barrera y Dueñas, 2014).

En nuestro estudio la administración de 1.0 mg/Kg de P<sub>4</sub> redujo la concentración de ALLO en ratas Wistar OVX ansiosas en contraste al aumento esperado después de la administración de P<sub>4</sub>. Esto podría estar asociado a diferencias metodológicas, por ejemplo en algunos estudios (Gutiérrez-García et al., 2000 y Bitrán et al., 1993) la ALLO se administró de manera sistémica y posteriormente se observó el efecto ansiolítico. En

nuestro estudio, se administró la P<sub>4</sub> y después de 60 min. Se midieron las concentraciones de ALLO. El descenso observado de ALLO en respuesta a la P<sub>4</sub> puede ser debido al tiempo transcurrido después de la administración, ya que se ha reportado que las concentraciones de ALLO se observan aumentadas antes de los 60 min. (Barbaccia et al., 1996). Otra posible explicación es que el descenso observado se deba a que la ALLO que se encontraba disponible fue utilizada por el organismo. Este dato concuerda con el hecho de que se haya observado un aumento en la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2, estos datos sugieren que el descenso de ALLO y el efecto ansiolítico en respuesta a P<sub>4</sub> podrían estar asociados.

Hasta el momento no se tienen reportes del efecto de la progesterona sobre los niveles de ALLO en WKY ansiosas. En este estudio en animales de la cepa WKY no se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas de ALLO ni en la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2. Una posible explicación es que la P<sub>4</sub> no se esté metabolizando y no se efectuó la conversión de P<sub>4</sub> a ALLO. Otra posible explicación es que en esta cepa se requiera de una dosis más alta a 1.0 mg/Kg de P<sub>4</sub>.

#### **8.4. Efecto de la progesterona sobre la expresión del RNAm de la enzima 5 $\alpha$ -R2 en hipocampo**

Dado que la ALLO es sintetizada a partir de la P<sub>4</sub>, por la enzima 5 $\alpha$ -R2, y puesto que los niveles de ALLO son modificados por situaciones de estrés (Purdy et al., 1991), es posible que la actividad de la enzima también sea modificada.

En animales Wistar se observó que la sola OVX incrementó la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2, lo que sugiere que el retiro de la fuente secretora de P<sub>4</sub> (ovarios) promueve la síntesis de la enzima, posiblemente como una respuesta compensatoria de las glándulas adrenales (Meléndez., 2005).

Ademas se observó que la administración de P<sub>4</sub> incrementa la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R tanto en animales SHAM como en OVX, lo que nos indica que los animales de la cepa Wistar están respondiendo al tratamiento con P<sub>4</sub>. Nuestros datos coinciden con lo que se ha reportado por otros grupos de investigación (Sánchez, 2007).

En contraste, en la cepa WKY no se observaron cambios en la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2 en respuesta a la OVX, lo que sugiere que el sistema de respuesta endocrina podría estar alterado o desensibilizado. Esta propuesta se refuerza con el hecho de que ante la administración de P<sub>4</sub>, no se detectaron cambios en la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2. Dado que se ha propuesto que el descenso de CORT está relacionado con la síntesis de ALLO (Rapkin, 2009; Estrada-Camarena et al., 2011; Schüle et al. 2014) es posible que en esta cepa el descenso en CORT provocado por la P<sub>4</sub> se deba a un mecanismo de regulación independiente a la ALLO, lo cual requiere una mayor exploración. Otra posible explicación es que la cepa WKY requiera una dosis de P<sub>4</sub> superior a la evaluada en este estudio, por lo que se requiere que en estudios posteriores se exploren estas posibilidades.

## **8.5. Campo Abierto**

Ambas cepas Wistar y WKY no registraron diferencias significativas en la actividad locomotriz independientemente del tratamiento y condición. Estos resultados confirman que no hubo alteración motora que afectara el desempeño en la prueba conductual de ED en ambas cepas. Es importante señalar que la cepa Wistar registró un aumento de números cruzados en comparación con las WKY. Esto comprueba que la WKY al tener menor actividad locomotriz, es una cepa más ansiosa, coincidiendo con lo ya reportado en diferentes modelos conductuales (Pare et al., 1989, 1992, 1994, 2001 y McAuley et al., 2009).

## 9. CONCLUSIONES

- El efecto ansiolítico de la P<sub>4</sub> es dependiente de la cepa estudiada ya que la WKY no respondió al tratamiento.
- La P<sub>4</sub> modula la expresión de la enzima 5 $\alpha$ -R2 y los niveles de ALLO en la cepa Wistar pero no en la WKY.
- La P<sub>4</sub> no induce efecto ansiolítico en la cepa WKY, probablemente porque la P<sub>4</sub> no es metabolizada a ALLO.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- American Psychiatric Association. 2000. Diagnostic and Statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR, Washington DC. American Psychiatric Association.
- Almela Z., Carrasco P., Colomina F., González B., Moya A., Redolar I., Suay I., Marjolein T., Vicens C. 2007. Hormonas, Estado de ánimo y función Cognitiva. Publicaciones Delta. España. 1-247.
- Arenas C. y Puigcerver A. 2009. Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. Escritos de Psicología. 3(1):20-29
- Bai Li X., Inoue T., Hashimoto S., Koyama T. 2001. Effect of chronic administration of flesinoxan and fluvoxamine on freezing behavior induced by conditioned fear. European Journal of Pharmacology 425: 43-50.
- Barbaccia M., Roscetti G., Trabucchi M., Mostallino M., Concas A., Purdy R., Biggio G., 1996. Time-Dependent Changes in rat Brain Neuroactive Steroid Concentrations and GABAA Receptor Function after Acute Stress. Neuroendocrinology. 63: 166-172.
- Becerra-García A., Madalena A., Estanislau C., Rodriguez-Rico J., Diaz H. 2007. Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y mal adaptaciones. Revista Latinoamericana de Psicología. 39 (1): 75-81.
- Bigg W y Demuth R. 2011. Premenstrual Syndrome an Premenstrual Dysphoric Disorder. American Family Physician. 84(8): 918-924.

- Bonilla A. 2012. Nuevas patologías psiquiátricas. Disponible en internet en: <http://www.psicologoslaureanocuesta.org> Con acceso en Agosto, 2013.
- Bose U., Indusekhar R., O'brien S. 2008. Hormonal management of premenstrual syndrome. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*. 22: 251-260.
- Braw Y., Malkesman O., Merlender A., Bercovich A., Dagan M., Maayan R., Weizman A., Weller A. 2006. Stress Hormones and emotion-regulation in two genetic animal models of depression. *Psychoneuroendocrinology*. 31: 1105-1116.
- Briones-Aranda A. 2006. Tesis: participación gabaérgica y serotoninérgica en el efecto ansiolítico por el nado forzado. IPN. México.
- Britan D., Hilvers R., Kellogg C. 1991. Anxiolytic effects of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$  [5 $\beta$ ]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABAA receptor. *Brain Research*. 561:157-161.
- Britan D., Purdy R., Kellogg C. 1993. Anxiolytic effects of progesterone is associated with increases in cortical allopregnanolone and GABAA receptor function. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 45: 423-428.
- Campagne D., Campagne G. 2007. Review: The premenstrual syndrome revisited. *European Journal of Obstetric & Gynecology and reproductive Biology*. 130:4-17
- Caravaca R., Castel G., Guzmán G., Delgado P., Mena G., Alcalde A., González R. 2005. Bases de la Reproducción Animal, Catalogo de

publicaciones Universidad de Sevilla, serie manuales universitarios. 61: 172-175

- Cárdenas J. y Navarro J. 2002. Modelos animales de ansiedad condicionada (II). *Psiquiatría Biológica*. 9:68-76
- Cárdenas P. 2012. Tesis: Efectos del estrés agudo sobre los niveles sistémicos de corticosterona y la memoria de la omisión de recompensa en tareas espaciales y no espaciales. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Carvalho C., Benítez F., Do Nascimento B., Rodríguez A., Egidio N., 2012. Bipolar disorder and Premenstrual Syndrome or Premenstrual Dysphoric Disorder comorbidity: a systematic review. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 34:467-479.
- Cassano P., y Argibay P. 2010. Depresión y neuroplasticidad: Interacción de los sistemas nervioso, endocrino e inmune. *Medicina*. 70(29): 185-19-
- Celotti F., Negri-Cesi P., Poletti A. 1997. Steroid Metabolism in the Mammalian Brain: 5alpha-Reduction and Aromatization. *Brain Research Bulletin*. 44 (4): 365-375-
- Cheng S., Shih C., Yang YK., Chen K., Chang Y., Yang YC. 2013. Factors associated with premenstrual syndrome: a survey of new female university students. *Journal of medical Sciences*. 29: 100-105..
- Chomczynski P., Sacchi N. 1986. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162:156-159.

- Curtis N. 2004. Comparison of clinical trials with finasteride and dutasteride. *Reviews in Urology*. 6:31-39
- Contreras C., Azamar-Arizmendi G., Saavedra M., Hernández-Lozano M. 2006. A five-day reduction regimen of chlormadinone reduces premenstrual anxiety and depression: a pilot study. *Archives of Medical Research*. 37: 907-913.
- Contreras C., Rodríguez-Landa J., Bernal-Morales B., Gutiérrez-García A., Saavedra M. 2011. Timing of progesterone and allopregnanolone effects in a serial forced swim test. *Salud Mental*. 34: 309-314
- Dávila R. El síndrome premenstrual, asociado a la ansiedad. 2011; Disponible en: <http://journalmex.wordpress.com>. Con acceso en Agosto, 2013
- De Boer S., Koolhaas JM. 2003. Defensive burying in rodents: Ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*. 463:145-161.
- De Costa J., Madrid J., Zamora S., Rodríguez J. 1993. *Fisiología animal-Prácticas*. Universidad de Murcia. Ed. Secretariado de publicaciones. 147-148.
- Diaz-Burke Y., González-Sandoval C., Valencia-Alfonso C., Huerta M., Trujillo X., Díaz L., García-Estrada J., Luquín S. 2010. Progesterone regulates corticosterone elevation and alterations in spatial memory and exploratory behavior induced by stress in Wistar rats. *Universitas Psychologica*. 9(3), 627-640.

- Dubrovsky B, 2004. Neurobiología de los síndromes depresivos y de estrés. Enfocado sobre los neuroesteroides y los neuroesteroides activos. *Psiquiatría*. 6:183-195
- Estrada-Camarena E., Sollozo-DuPont I., Islas-Preciado D., López-Rubalcava C. 2011. Psychoneuroendocrinology: role of hypothalamic-pituitary-gonadal/ adrenal axis in the premenstrual syndrome. *Research Signpost*. México. 115-130.
- Fernández-Guasti A., Saldivar G., Picazo O., Roldán R., 1990. Relaciones entre la ansiedad y la conducta sexual en roedores. *Salud Mental*.13:35:44
- Fernández-Guasti y Picazo O. 1992. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology*. 17:6: 681-689
- Finn D., Beadles-Bohling A., Beckley E., Ford M., Gililand K., Gorin- Mayer R., Wren K . 2006. A new look at the 5 $\alpha$ -Rinhibitor finasteride. *DrugReviews*. 12:53-76
- Gallo MA., Smith SS. 1993. Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacology Biochemistry & Behaviour*. 46: 897-904.
- García S. 2007. Tesis: Acción de melatonina sobre la producción de Corticosterona inducida por ACTH en la glándula adrenal de rata en cultivo. Universidad Austral de Chile. 5-12, 44.
- Girdler S., Straneva P., Light K., Pedersen C., Morrow A. 2001. Allopregnanolone levels and reactivity to mental stress in premenstrual dysphoric disorder. *Biological Psychiatry*., 49: 788-797.

- Gómez C., Saldivar-Gonzalez A., Rodríguez R. 2002. Modelos animales para el Estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*. 25: 14-24
- González G. 1999. Neuroendocrinología. *Revista peruana de endocrinología y metabolismo*. 4(29). 57-82
- Gutiérrez-García A., Contreras C., Díaz-Meza J. 2000. Cómo actúa la progesterona sobre el sistema nervioso central. *Salud Mental*. 23: 42-48
- Henderson V. 2007. Neurología de la menopausia. *Revista del Climaterio*. 11:16-31
- Hernández A. 2005. Tesis: Valoración de la Ansiedad y la Depresión experimental en un modelo animal de post menopausia. IPN. México
- Hurlé M. 2012. *Farmacología Humana*. Masson. Barcelona, España. 453-467.
- Indusekhar R., Bose Usman S., O'Briend S. 2006. Psychological aspects of premenstrual syndrome. *BestPractice and ResearchClinicalObstetrics and Gynaecology*. 21:207-220
- Kalueff A., Tuohimaa P. 2004. Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiologic. Exp.*64:439-448.
- Kalueff, A., Tuohimaa P. 2005. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neuroscience Methods*. 143:169-177.

- Justel N., Bentosela M., Musteca A. 2009. Comportamiento sexual y ansiedad. *Revista Latinoamericana de Psicología*. 41: 429-444.
- Lahmame A., Del Arco C., Pazos A., Yritia M., Armario A. 1997. Are Wistar-Kyoto rats a genetic animal model of depression resistant to antidepressants?. *European Journal of Pharmacology*. 337: 115-123.
- Leonard B. 2006. HPA and Immune Axes in Stress: Involvement of the Serotonergic System Neuroimmunomodulation. *European Journal of Pharmacology*. 13:268-276.
- Löfgreen M., Johansson I., Meyerson B., Turmen S., Bäckström T. 2009. Withdrawal effects from progesterone and estradiol relate to individual risk-taking and explorative behavior in female rats. *Physiology and behavior*. 96: 91-97.
- Luna M., Hamana Z., Colmenares Y., Maestre C. 2001. Ansiedad y depresión. *Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica*. 20:111-122.
- Martínez- Mota L., Estrada-Camarena E., López-Rubalcava C., Contreras C., Fernández-Guasti A. 2000. Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 25:109-120.
- McAuley J., Stewart A., Webber E., Cromwell H., Servatius R., Pang K. 2009. Wistar-Kyoto rats as an animal model of anxiety vulnerability: Support for a hypervigilance hypothesis. *Behavioural brain research*. 204 (1): 162-168.

- Meléndez de la Rosa G. 2005. Tesis: Papel de las glándulas suprarrenales y los ovarios en la secreción de progesterona durante el ciclo estroal de la rata. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Mendoza P. 2008. Farmacología médica. Panamericana. México.132-134.
- Nariño D., Del Pilar Grillo MC. 2005. Epilepsia cateminal. Acta Neurológica Colombiana. 21:25-33
- Nyberg S. 2011. How to determine symptom severity in premenstrual syndrome: A combination of daily symptom rating and interviews. Sexual& reproductive healthcare. 2:161-168
- Pare W. 1989. Stress ulcer and open-field behavior of spontaneously hypertensive, normotensive, and Wistar rats. Journal of BioSciences. 24:45-57.
- Pare W. 1992.the performance of WKY rats on three test of emotional behavior. Physiology and Behaviour. 51:1051-1056.
- Pare W. 1994. Open field, learned helplessness, conditions defensive burying, and force-swim test in WKY rats. Physiology & behaviour. 55: 433-439
- Pare W., Tejani-Butt S., Kluczynski J. 2001. The emergence test: effects of psycotropic drugs on neophobic disposition in Wistar-Kyoto (WKY) and Spague-Dawley rats. Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry. 25: 1615-1628.

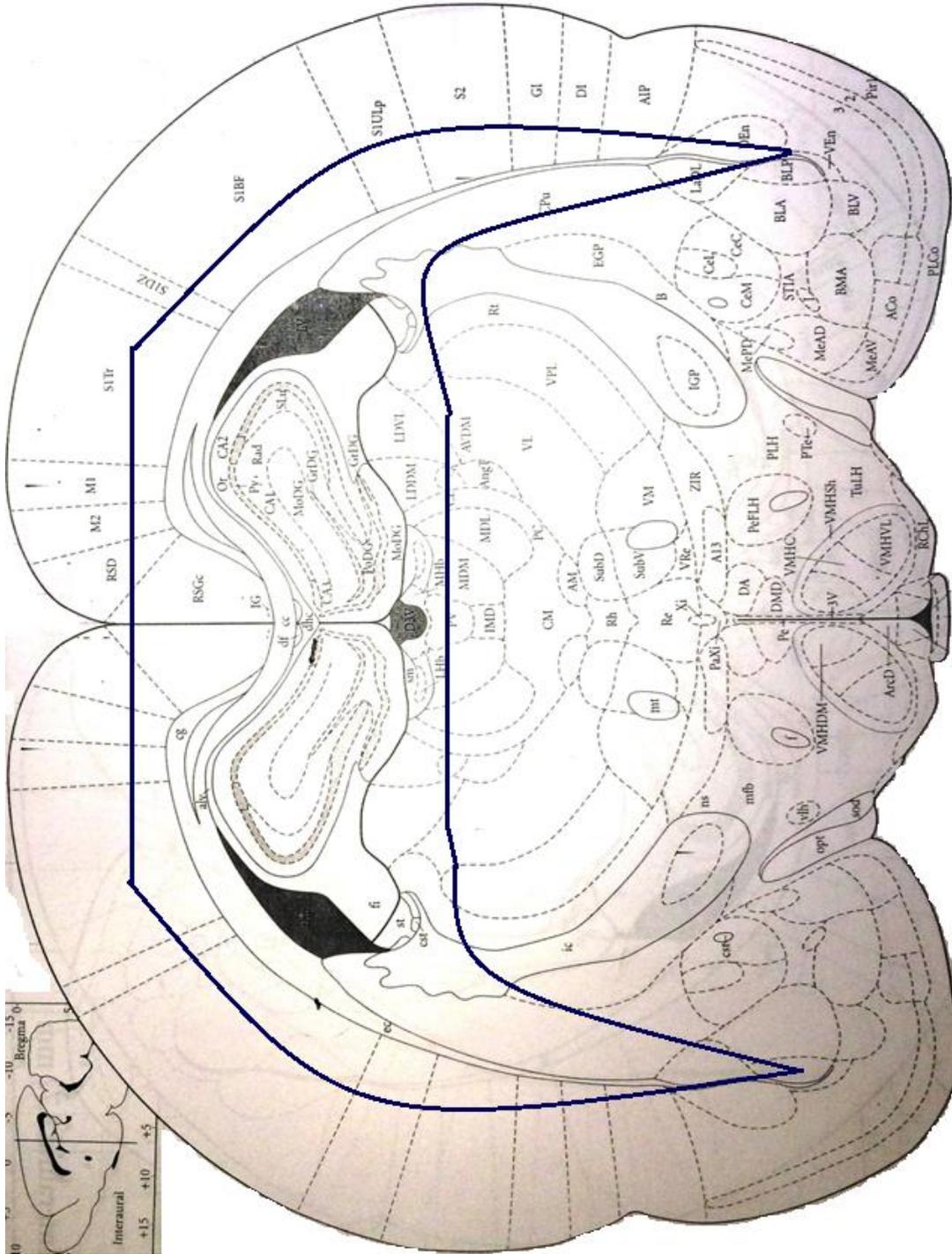
- Paxinos G. y Watson G. 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5ta. Elsevier. USA.
- Pinel J., Treit D. 1978. Defensive burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative Physiological Psychology*. 92:708-712.
- Polanco A., Vargas I., Góngora E. 2011. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*. 18:141-148.
- Purdy R., Morrow A., Moore P., Paul S. 1991. Stress-induced elevations of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Neurobiology*. 88: 4553-4557.
- Rahimi-Ardabili B., Pourandarjani R., Habibollahi P., Mualeki A. 2006. Finasteride induced depression: a prospectivestudy. *Biomed central Clinical Pharmacology*. 6: 1-6.
- Rapkin A. 2003. A review of treatment of premenstrual syndrome & premenstrual dysphoric disorder. *Psycho neuroendocrinology* 28: 39-53.
- Rapping A. 2009. Tratamiento del trastorno disfórico premenstrual con drospirenona y etinilestradiol. *Journal of Reproductive Medicine*. 5:729-741.
- Redei E., Solberg L., Kluczynski J., Pare W. 2001. Paradoxical Hormonal and Behavioral Responses to Hypothyroid and Hyperthyroid States in the Wistar–Kyoto Rat. *Neuropsychopharmacology*. 24, 632–639.

- Rejón-Orantes, Placer P., Roldan G. 2002. Artículo de revisión: pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. Universidad de medicina de Bogotá. 52(1): 78-89.
- Reyes S., Fernández-Guasti A. 2006. Las hembras: Cambios en el estado hormonal y los psicofármacos. *Farmaconductual*.139-144.
- Riveros-Barrera y Dueñas Z. 2014. Efecto de la alopregnanolona sobre la ansiedad en ratas con separación materna durante la lactancia. *Revista de la Facultad de Medicina*. 62(2): 229-236.
- Rodríguez-Landa J., Contreras C. 1998. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Revista Biomedica*. 9:181-191.
- Rodríguez-Landa J., Contreras C., García-Ríos R. 2009. Allopregnanolone microinjected into the lateral septum or dorsal hippocampus reduces immobility in the forced swim test: participation of the GABAA receptor. *Behavioural Pharmacology*. 20(7):614-622.
- Rogel –Salazar y López-Rubalcava. 2011. Evaluation of the anxiolytic-like effects of clomipramine in two rat strains with different anxiety vulnerability (Wistar and Wistar-Kyoto rats): participation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behavioural Pharmacology*. 22:136-146.
- Römer B., Gass P. 2010. Finasteride-induced depression: new insights into possible pathomechanisms. *Journal of cosmetic dermatology*. 9: 331-332.

- Sánchez P. 2007. Tesis: Estudios de los niveles de mRNA de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa en diferentes situaciones experimentales de la rata. Universidad de Granada. Colombia.
- Sánchez P., Torres J., Gavete P., Ortega E. 2007. Effects of swim stress on mRNA and protein levels of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme in prefrontal cortex of adult male rats. *Neurochemistry International*. 52:426-431. *Est in wild house mice. Physiology and Behavior*. 4(67): 579-585.
- Schüle C., Nothdurfter C., Rupprecht R. 2014. The role of allopregnanolone in depression and anxiety. *Progress in Neurobiology*. 113: 79-87.
- Sluyter F., Korte S., VanBaal G., De Ruiters., VanOrtmenrssen G. 1999. Y chromosomal and sex effects on the Behavioral stress response in the defensive Burying test. *Physiology Behavior*. 67(4): 579-585.
- Sollozo-Dupont I., Estrada-Camarena E., López-Rubalcaba C. 2011. Medicina tradicional: Estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. *Medigraphic* 6:78-84.
- Tesler L y Arias P. 2007. Hormonas sexuales y conducta. *Endocrinología ginecológica y Reproductiva*. 36:10-20.
- Torres J y Ortega E. 2006. Steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in the adult female rat brain central role of dihydrotestosterone. *Journal of Molecular Endocrinology*. 36:239-245.
- Torres J., Sanchez P., Ortega E. 2004. Quantitation of mRNA levels of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes in the rat brain by "one-step" RT-PCR and capillary electrophoresis. *Journal of Neuroscience Methods*. 136: 105-110.

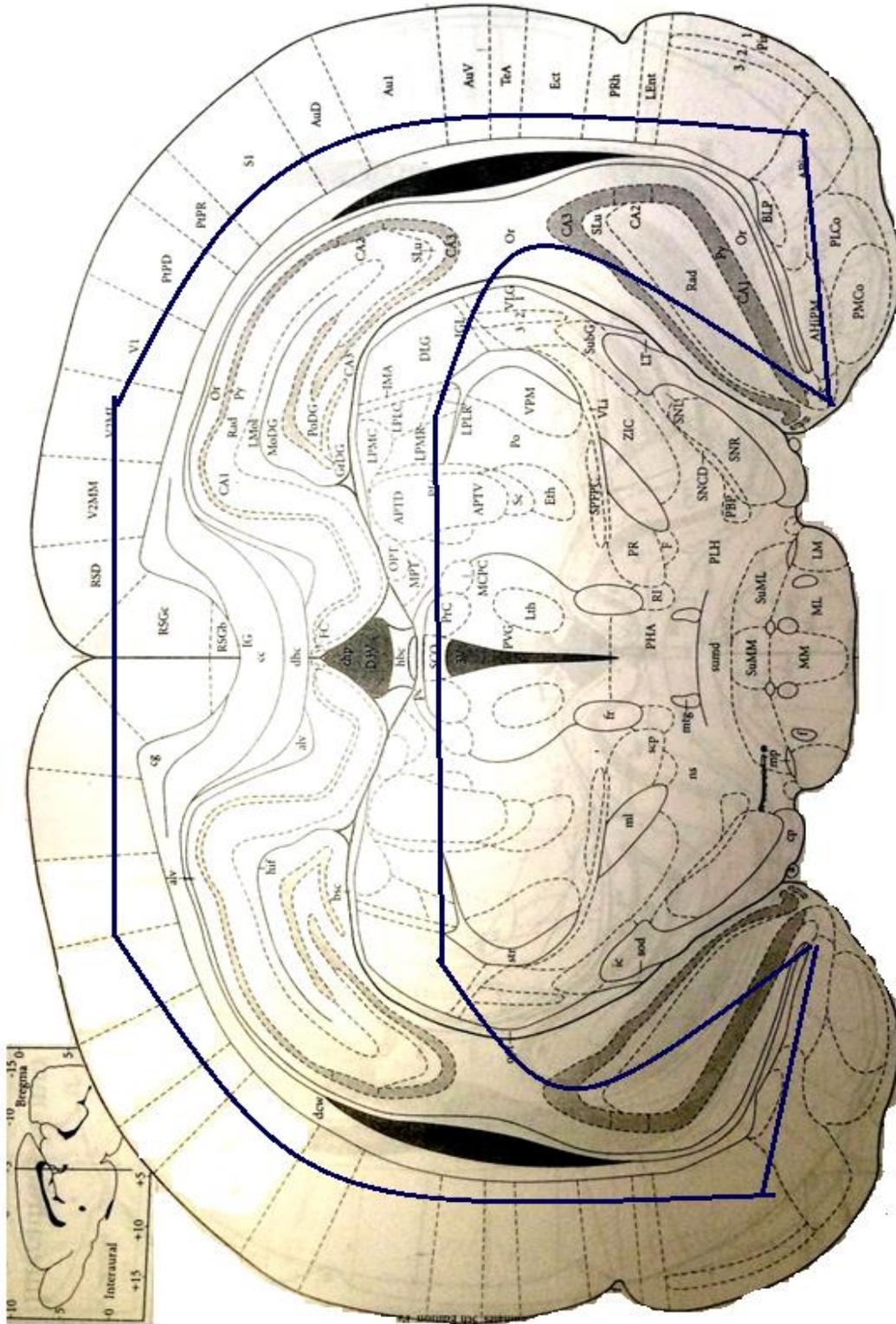
- Vilchez C. 2011. Tesis: Efectos de la hiperprolactinemia sobre los niveles de ARNm de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa en ratas. Universidad de granada. Colombia.
- Will C., Aird F., Redei E. 2003. Selectively bred Wistar Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Molecular Psychiatry*. 8: 925-932.

# 11. ANEXO



— Área del corte de hipocampo

Fig.15 Esquema representativo de corte de Hipocampo. Bregma -2.40 mm (Paxinos y Watson, 2005)



— Área del corte de hipocampo

Fig.16 Esquema representativo de corte de Hipocampo. Bregma -4.56 mm (Paxinos y Watson, 2005)