



*UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO*



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE PSICOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO TIPO ANSIOLÍTICO DEL 17B-AE PROLAME EN
UN MODELO ANIMAL DE PERIMENOPAUSIA

T E S I S

Que para obtener el título de.

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

Presenta.

ERIKA GARCÍA ALBOR

JURADO DEL EXAMEN

Director de tesis: Dra. Lucía Alba Martínez Mota

Comité evaluador: Dr. Alejandro Valdés Cruz

Dra. Lucía Alba Martínez Mota

Dr. Víctor M. Magdaleno Madrigal

Dra. Lilia Mestas Hernández

Mtra. Emma P. Pérez Hernández



Ciudad de México, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología Conductual de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), bajo la dirección de la Dra. Lucía Martínez Mota, con la asesoría de la Dra. Cristina Lemini Guzmán, del laboratorio de Farmacología Endocrina, de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La presente investigación fue financiada por los proyectos IN218813 PAPIT UNAM y el Proyecto Federal Atención de la Salud Reproductiva y la Igualdad de Género en Salud (P07) del INPRFM. La alumna recibió apoyo financiero del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad y del proyecto IN218815 PAPIT UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Lucía Martínez Mota por su apoyo y paciencia incondicional para la realización de la presente tesis, así como el tiempo que permanecí bajo su tutoría durante el servicio social y las prácticas profesionales en el INPRFM. Hago extensivos los agradecimientos para la Dra. Cristina Lemini, por su apoyo y donación de los fármacos utilizados. De igual forma, a los investigadores del INPRFM, la Dra. Patricia de Gortari Gallardo por las facilidades para la determinación hormonal de los datos utilizados en esta tesis, al Biol. Gilberto Matamoros por la realización de dichas determinaciones, así como al Dr. Jaime Herrera Pérez y el Tec. Sergio Márquez, por su apoyo y asesoría para aprender las técnicas utilizadas y sus demás aportaciones para la realización de este trabajo. A la Dra. Sandra Olvera Hernández por la facilitación en la donación de los animales de ME, y a la Dra. Maribel Olivares Nazario por sus valiosos comentarios para el escrito final de este proyecto.

De igual manera agradezco a los miembros del jurado, Dr. Alejandro Valdés Cruz, Dra. Lucía Alba Martínez Mota, Dr. Víctor M. Magdaleno Madrigal, Dra. Lilia Mestas Hernández y Mtra. Emma P. Pérez Hernández, por su apoyo en el proceso de titulación y por tomarse el tiempo de revisar esta tesis, así como por su aportación y valiosos comentarios para mejorar el escrito.

Por último agradezco al personal administrativo del INPRFM y de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la facilidad para realizar todos los trámites relacionados al presente trabajo.

DEDICATORIAS

El trabajo final, fue resultado de un largo proceso en el cual participaron diversas personas, no solo en el aspecto académico sino en el aspecto personal. Compañeros, familia, amigos, etc. que me brindaron su apoyo incondicional para realizarlo. Por eso quiero dedicar mi tesis a Maribel Olivares y Sergio Márquez por su amistad y apoyo durante todo el tiempo que compartimos fuera y dentro del INPRFM, a mis hermanos y mi padre por darme ánimos y seguridad en este proceso, a la memoria de mi abuela Berta Hinojosa, que en vida me brindo mucho cariño y apoyo, y a quien prometí que terminaría mi carrera. Y principalmente dedico todo el esfuerzo y trabajo a las personas que más amo, mi madre que ha sido mi principal apoyo y sustento en todos los sentidos, y mi hija que cada día es el motor de mi vida.

...se acercó a la ventana, miró
hacia abajo, a la calle cubierta de
basura, a las personas que
gritaban y cantaban, luego alzó la
cabeza al cielo y lo vio todo
blanco, -ahora me toca a mí-
pensó. El miedo súbito le hizo
bajar los ojos, la ciudad aún
estaba allí.

José Saramago

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	III
Cuadros, Tablas y Figuras	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
Capítulo 1. ANSIEDAD	3
1.1 Trastornos de ansiedad.....	3
1.1.1 Incidencia y prevalencia.....	4
1.2 Trastornos de ansiedad generalizada y trastorno por agorafobia.....	5
1.3 Neurobiología de la ansiedad	6
1.4 Tratamientos ansiolíticos.....	8
Capítulo 2. ENDOCRINOLOGÍA DE LA MUJER	11
2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-gónada	11
2.2 Perimenopausia, menopausia y postmenopausia.....	13
2.3 Terapia de reemplazo hormonal	15
Capítulo 3. CICLO ESTRAL DE LA RATA Y ENVEJECIMIENTO	17
Capítulo 4. ESTRÓGENOS	21
4.1 Efecto de los estrógenos en el SNC.....	22
4.2 17β –Aminoestrógeno prolame.....	23
Capítulo 5. MODELOS ANIMALES	27
5.1 Modelos animales de ansiedad.....	27
5.1.1 Laberinto elevado en cruz.....	28
5.1.2 Enterramiento defensivo	30
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
IV. OBJETIVOS	33
General	33
Particulares	33
V. HIPÓTESIS	34
VI. METODOLOGÍA	35

Diseño	35
Variables	37
Pruebas conductuales	38
Medición de efectos tróficos sobre el tejido uterino	40
Medición de efectos sobre mediadores fisiológicos	41
Material e instrumentos	41
Procedimiento general	42
Análisis estadístico	44
VII. RESULTADOS	45
Efecto ansiolítico de prolame Y E₂	45
Efecto de prolame y E₂ sobre la actividad motriz	51
Efecto trófico de prolame y E₂ sobre el tejido uterino	53
Efecto de los tratamientos sobre mediadores fisiológicos	54
VIII. DISCUSIÓN	56
Efecto ansiolítico del prolame Y E₂ en ratas hembra	57
Efectos de prolame y E₂ sobre la actividad motriz	66
Efectos tróficos de los tratamientos sobre el peso del útero	67
Efecto de los tratamientos sobre los niveles de E₂ y corticosterona	69
IX. CONCLUSIONES	72
X. PERSPECTIVAS	74
XI. REFERENCIAS	75
XII. APÉNDICE	87

Lista de abreviaturas

#C	Número de cruces
#Ch	Número de choques
5HT	Serotonina
AE	Aminoestrógeno
AEs	Aminoestrógenos
AJ-Ovx	Adulta joven ovariectomizadas
CA	Campo abierto
DA	Dopamina
E ₂	17β-estradiol
ED	Enterramiento defensivo
EEC	Estrógenos equino conjugados
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	La hormona liberadora de gonadotrofinas
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
ISRS _s	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
LE	Latencia de enterramiento
LEC	Laberinto elevado en cruz
LH	Hormona luteinizante
ME-Int	Mediana edad intactas
ME-Ovx	Mediana edad ovariectomizadas
NA	Noradrenalina
ON	Óxido nítrico
Ovx	Ovariectomizadas
P4	Progesterona
RE	Receptores a estradiol
SNC	Sistema nervioso central
TA	Trastorno de ansiedad
TAG	Trastorno de ansiedad generalizada

TBA	Tiempo en brazos abiertos
TBC	Tiempo en brazos cerrados
TC	Tiempo en el centro
TE	Tiempo de enterramiento
TF	Tiempo de <i>freezing</i>
TRH	Terapia de reemplazo hormonal
TOC	Trastorno obsesivo-compulsivo

Cuadros

- Cuadro 1. Comparación del TAG y la agorafobia según el DSM-IV-TR.
- Cuadro 2. Estructuras cerebrales y fisiopatología de los síntomas de la ansiedad.
- Cuadro 3. Fármacos con efecto ansiolítico.
- Cuadro 4. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la ansiedad.
- Cuadro 5. Expresión de los RE en áreas cerebrales.
- Cuadro 6. Criterios de confiabilidad y validez de los modelos animales.
- Cuadro 7. Efecto de ansiolíticos y diferentes factores hormonales sobre el TBA.
- Cuadro 8. Efecto de ansiolíticos y factores hormonales en la prueba de ED.

Tablas

- Tabla 1. Animales que expresaron la conducta de enterramiento.
- Tabla 2. Efecto del E₂ y del prolame sobre la concentración sérica de corticosterona y E₂.
- Tabla 3. Resumen de los resultados obtenidos con el Tx crónico de E₂ y prolame.

Figuras

- Figura 1. Esquema del eje HHG y su función durante el ciclo menstrual.
- Figura 2. Descripción general de las etapas reproductivas y la no reproductiva de la mujer.
- Figura 3. Cambios en los niveles de E₂, FSH y LH durante la menopausia.
- Figura 4. Niveles de P4, E₂ y LH a lo largo del ciclo estral de la rata.
- Figura 5. Esquema de la fase reproductiva y las no reproductivas de la rata.
- Figura 6. Estructura química del E₂ y los 17 β -Aes.
- Figura 7. Efecto de los AEs y el E₂ sobre el tiempo de coagulación de la sangre.
- Figura 8. Dispositivo de la prueba de LEC.
- Figura 9. Caja de la prueba de ED.
- Figura 10. Diseño del estudio.
- Figura 11. Esquema temporal del experimento.
- Figura 12. Efecto de los tratamientos en la prueba de LEC.

Figura 13. Efecto de los tratamientos en el ED.

Figura 14. Efecto de los tratamientos en el CA.

Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre el peso uterino.

I. INTRODUCCIÓN

La ansiedad forma parte de un mecanismo de defensa que prepara al organismo para responder a una amenaza real o percibida; se caracteriza por temor, nerviosismo, tensión motora, vigilia e irritabilidad, entre otros síntomas (APA, 2013). Los trastornos de ansiedad tienen una prevalencia del 35% en mujeres en edad reproductiva, mientras que en el periodo de postmenopausia la cifra se duplica (Salomon et al., 2012). A lo largo de la vida reproductiva, las mujeres reportan menos ansiedad en etapas en donde la concentración de estrógenos es baja o en etapas donde esta concentración es estable, respecto a etapas como la menopausia y la perimenopausia, donde los niveles de estas hormonas son fluctuantes (Frye, 2009). Esto sugiere que las hormonas gonadales son capaces de regular los síntomas de ansiedad.

Las terapias de reemplazo hormonal (TRH) con estrógenos mejoran los signos y síntomas asociados al envejecimiento gonadal y reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, osteoporosis o alteraciones metabólicas que son comunes en la menopausia (J. E. Rossouw et al., 2002), aunque los efectos benéficos pueden variar en función de la edad y del tipo de estrógeno administrado. Las TRH con estrógenos también mejoran parámetros en la salud mental de la mujer; concretamente, se ha reportado que producen efectos ansiolíticos y antidepressivos comparables a los de fármacos de referencia, como los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Sin embargo, el uso de las TRH está limitado por sus efectos adversos, especialmente por el riesgo de padecer cáncer de mama y de eventos tromboembólicos (Cushman et al., 2004). En consecuencia, resulta necesario evaluar nuevas moléculas capaces de mantener las acciones benéficas de los estrógenos, pero que produzcan menos efectos adversos que éstos.

Al respecto, prolame es un estrógeno sintético con propiedades similares a las del estrógeno natural 17β -estradiol (E_2), pero con menor potencia. En su estructura química posee un grupo amino (NH_2) y una cadena de 3C en la posición 17 del anillo D, sustituyendo al grupo hidroxilo (OH) del E_2 ; este cambio le confiere

una actividad anticoagulante, contraria al efecto procoagulante del E₂, lo que podría representar una ventaja terapéutica. Estudios de laboratorio han mostrado que prolame produce importantes efectos ansiolíticos y antidepresivos en ratas hembra adultas jóvenes con hipoestrogenismo inducido por ovariectomía (Lemini, Cruz-Lopez, & Martinez-Mota, 2013; Lemini, Garcia-Albor, Cruz-Lopez, Matamoros-Trejo, & Martinez-Mota, 2016). Sin embargo, no se ha considerado el hecho de que la edad es un factor relevante para la respuesta adecuada a las TRH. El objetivo de este trabajo fue investigar si el tratamiento con prolame produce efectos ansiolíticos en ratas de mediana edad, que constituyen un modelo de menopausia que reproduce el hipoestrogenismo asociado al envejecimiento. El efecto ansiolítico del prolame se comparó con el de E₂ en dos modelos de ansiedad experimental; además, se investigó si el tratamiento produce efectos adversos en el útero y en la locomoción de los animales. Los resultados obtenidos aportan evidencia de que el prolame es un fármaco con potencial terapéutico que puede ser utilizado en una TRH durante etapas como la perimenopausia y menopausia, para tratar entre otros síntomas, la ansiedad, cuya población blanco son las mujeres maduras con supresión hormonal por envejecimiento ovárico.

II. MARCO TEORICO

Capítulo 1. ANSIEDAD

El equilibrio y bienestar en un organismo pueden alterarse por factores del medio ambiente, éstos desencadena cambios fisiológicos que permiten la respuesta de lucha o huida: por ejemplo, aumento de la tensión muscular, cambios metabólicos para facilitar la disponibilidad de energía, disminución del sueño y de la alimentación, entre otros (De Boer & Koolhaas, 2003; Koob, 1998). No obstante, el cuerpo incrementa la respuesta cuando no se elimina la fuente de estrés, lo que puede deteriorar la salud física y mental del organismo y, en muchos casos, induce trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad (APA, 2013).

La ansiedad forma parte de un mecanismo de alerta que ayuda al organismo a emitir respuestas defensivas pasivas o activas, contribuyendo a la adaptación y supervivencia de la especie. Este tipo de ansiedad involucra el miedo anticipado a amenazas futuras que pueden ser o no reales, cuya intensidad varía dependiendo de la naturaleza del estímulo y del tiempo de exposición a éste (Heinze, 2003). Los síntomas de la ansiedad normal son: temor, preocupación excesiva, inquietud, irritabilidad, nerviosismo, estado de vigilia, escalofrío, dificultad en la concentración, insomnio, disfunciones sexuales, inseguridad y sensación de debilidad; además, se acompañan de cambios fisiológicos similares a los producidos por el estrés. Normalmente la sintomatología desaparece cuando se elimina la fuente de ansiedad; sin embargo, si los síntomas se presentan de manera inesperada ante un estímulo inofensivo o ausente, o bien persisten en ausencia del estímulo, se considera un Trastorno de Ansiedad (APA, 2013). Estas condiciones incapacitan al individuo para enfrentarse a su medio ambiente, generando una discapacidad que afecta su entorno y deteriora su calidad de vida.

1.1 Trastornos de ansiedad

En el Manual Diagnóstico y Estadístico de las Enfermedades Mentales [DSM-V por sus siglas en inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*] (APA,

2013), existen 12 tipos de trastornos de ansiedad (TA), entre ellos la fobia específica, la fobia social, el trastorno por estrés agudo y el trastorno de ansiedad generalizada (TAG). En los cuales se pueden presentar crisis de angustia y agorafobia, además es frecuente observar manifestaciones de miedo excesivo y expectación aprensiva. Los TA difieren en el tipo de estímulo que desencadena el cuadro, así como en la ideación cognitiva y las respuestas conductuales a las que recurre el sujeto para calmar la ansiedad; sin embargo, en todos los casos las alteraciones son crónicas, recurrentes y pueden desencadenar otros trastornos, como el consumo de sustancias (Perna, Dacco, Menotti, & Caldirola, 2011). Es posible que los trastornos de ansiedad se presenten como entidad única, aunque el 19.2 % de los casos cursa además con patologías como la depresión o el trastorno bipolar (APA, 2013; Nutt, Ballenger, Sheehan, & Wittchen, 2002).

1.1.1 Incidencia y prevalencia

Los TA afectan al 8.3% de la población general y constituyen uno de los padecimientos más frecuentes en México (Berlanga, Mendieta, Alva, & del Carmen Lara, 2003). Su prevalencia es mayor en mujeres, con una proporción 2:1 con respecto al varón (APA, 2013; Montelongo, Lara, Morales, & Villaseñor, 2005). El 18.5% de las mujeres mexicanas han padecido un TA en su vida (Berlanga et al., 2003), ocupando la posición 10 en la lista de psicopatologías que afectan a esa población (Millan, 2003). La incidencia de los TA se duplica en mujeres maduras y durante etapas críticas de la vida como el primer trimestre de la gestación, los días previos a la menstruación, la perimenopausia y la postmenopausia (Benjet et al., 2009), y se encuentran en el lugar 16 de las enfermedades que causan discapacidad en mujeres, de acuerdo con estadísticas de la Carga Mundial de Morbilidad (Salomon et al., 2012).

Entre los TA con mayor prevalencia en la mujer se encuentran el TAG y la agorafobia (Cuadro 1), que difieren en sus síntomas más característicos pero comparten la sintomatología específica de la ansiedad (APA, 2013; OMS, 2000).

1.2 Trastorno de ansiedad generalizada y Agorafobia

El TAG es un estado de ansiedad y preocupación excesiva incontrolables que se presentan durante la mayor parte del tiempo, no se limitan a alguna situación específica y persisten por un mínimo de 6 meses. El trastorno es crónico y puede tener fluctuaciones en la gravedad y frecuencia de los síntomas (APA, 2013). De acuerdo con el DSM-V un sujeto con TAG puede presentar conducta inhibitoria y afectividad negativa. Otros autores como (Koob, 1998), subrayan la presencia de temor, nerviosismo, vigilia, dificultad en la concentración, sentimiento de inseguridad y baja tolerancia, acompañados de transpiración, debilidad, palpitaciones, tensión motora, escalofrío y temblor.

Cuadro 1. Comparación del TAG y la agorafobia (DSM-V)	
Trastorno de ansiedad generalizada	Agorafobia
Ansiedad y preocupación excesivas por más de 6 meses.	El miedo, la ansiedad o la evitación son continuos y duran más de 6 meses.
Al menos tres de los siguientes síntomas: inquietud, fatiga, dificultad para concentrarse, irritabilidad, tensión muscular y alteraciones del sueño.	Miedo o ansiedad intensa en al menos dos de las siguientes situaciones: uso de transporte público, estar en espacios abiertos o sitios cerrados, hacer fila o estar en medio de una multitud, estar fuera de casa solo. Ansiedad en situaciones o lugares de los que resulta difícil escapar.
Malestar clínico y deterioro social o laboral.	Malestar clínico y deterioro social o laboral
Dificultad para controlar este estado.	Las situaciones que causan agorafobia se evitan o se pueden resistir pero con miedo o ansiedad, o la persona requiere la presencia de un acompañante para afrontarlas. Estas situaciones casi siempre provocan miedo o ansiedad, que es desproporcionado al peligro.
No se debe a efectos fisiológicos de una sustancia o a alguna otra afección médica.	H) Si existe otra afección médica, el miedo, ansiedad o evitación son claramente excesivos.
No se puede explicar mejor por otro trastorno mental.	I) El miedo ansiedad o depresión no se explican mejor por otro trastorno mental.

Información tomada del Manual Diagnóstico y Estadístico de las Enfermedades Mentales, DSM-V (APA, 2013).

A diferencia del TAG, la Agorafobia se caracteriza por miedo, ansiedad anticipatoria y conductas de evitación que presenta un sujeto en lugares o situaciones donde resulta difícil escapar, por ejemplo, el transporte público o el

automóvil, espacios abiertos o cerrados, o bien durante actividades como salir solo o cruzar un puente (Montelongo et al., 2005). Los síntomas no se limitan a una sola situación ni a acontecimientos de carácter social; se presentan por más de seis meses y en un 50% de los casos, se acompañan de ataques de pánico (APA, 2013).

1.3 Neurobiología de la ansiedad

Eventos como un accidente, cualquier tipo de violencia o abuso, o incluso el mismo estrés cotidiano o crónico pueden ser un detonante para desarrollar ansiedad. Sin embargo los TA tienen una etiología multifactorial en la que confluyen factores genéticos, fisiológicos y del medio ambiente. El riesgo de presentar un cuadro de ansiedad patológica aumenta si la persona tiene algún familiar directo que haya sufrido uno. Adicionalmente, existen factores fisiológicos que aumentan la vulnerabilidad, entre ellos las variaciones hormonales que ocurren durante la vida reproductiva de la mujer (Lydiard, 2003).

Diversas estructuras corticales, subcorticales y del tallo cerebral están implicadas en la integración de la respuesta de ansiedad, como se muestra en el Cuadro 2. Los procesos emocionales, afectivos y cognoscitivos de ésta se regulan por diversos neurotransmisores y neuromoduladores (Montelongo et al., 2005), principalmente por monoaminas como la serotonina (5-HT), la dopamina (DA) y la noradrenalina (NA), y por el ácido γ -aminobutírico (GABA), el neurotransmisor inhibitor más importante del sistema nervioso central (SNC) (Goldberg, Hollister, & Robertson, 1983; Louie, Lannon, & Ketter, 1989). En consistencia, estudios como los de Charney, Woods, Goodman, & Heninger (1987); George et al. (1995); Tancer et al. (1994), reportan que los agonistas de receptores a 5-HT inducen un efecto ansiogénico, al igual que los precursores L-triptófano y 5-hidroxitriptófano (Nutt & Cowen, 1987). Otros trabajos han relacionado cambios en los receptores β -adrenérgicos con la presencia de ataques de pánico y con la sintomatología de la ansiedad (Maranon, 1924; Nesse, Cameron, Curtis, McCann, & Huber-Smith, 1984; Rainey et al., 1984). De manera importante, la expresión de ésta se atribuye a una disminución del tono GABAérgico, lo cual se sustenta en que los principales

fármacos ansiolíticos actúen mejorando dicha neurotransmisión (O'Connor, Nock, & McEwen, 1988).

Cuadro 2. Estructuras cerebrales y fisiopatología de los síntomas de la ansiedad	
Estructuras	Función
Sustancia periacueductal gris	Recibe información de la corteza paralímbica y del sistema límbico y participa en el control de respuestas autónomas. La estimulación de su zona ventrolateral induce respuestas de <i>freezing</i> , hipotensión y analgesia, mientras que la activación de la región lateral produce taquicardia e hipertensión.
<i>Locus coeruleus</i>	Es un núcleo noradrenérgico con aferencias a la corteza, al sistema límbico y al tálamo. Se activa con el estrés y se relaciona directamente con las respuestas autonómicas y de alerta. Su estimulación excesiva puede producir ataques de pánico, los cuales se inhiben al lesionar esta estructura.
Sistema límbico	Está formado por estructuras corticales y subcorticales que regulan la expresión de respuestas emocionales, principalmente aquellas asociadas con la supervivencia de la especie.
Amígdala	Tiene conexiones con áreas relacionadas a la ansiedad, además, participa en el control locomotor, neuroendocrino y autónomo de dicha respuesta, como las conductas defensivas y la memoria emocional. La región basolateral de la amígdala integra y proyecta la información integrada hacia sus núcleos centrales, divididos en las porciones central medial y central lateral. La porción medial envía la información al hipotálamo y al tallo cerebral, mientras que su inhibición por la porción lateral reduce las respuestas de ansiedad.
Hipocampo	Se asocia con procesos de aprendizaje y memoria, incluyendo aquellos de tipo emocional. Participa en la regulación del eje del estrés a través de sus receptores a glucocorticoides, los cuales median el mecanismo de retroalimentación negativa del eje.
Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)	Conocido como el eje del estrés, ya que controla la síntesis y liberación de cortisol. En condiciones de estrés crónico, un exceso de cortisol (o corticosterona, en roedores) desensibiliza los receptores a glucocorticoides (RGC), por lo que el asa de retroalimentación del eje sufre una alteración, y altos niveles de cortisol se asocian a daño hipocampal y a la incapacidad para detener el estrés. La función de este eje se ha visto afectada en personas con TA.

Información recuperada de Adhikari 2014, Boehme et al. 2014, Handa & Weiser 2014, Redmond 1985, Sandford, Argyropoulos, & Nutt 2000).

Las hormonas sexuales también participan en los estados de ansiedad, ya que regulan la síntesis, liberación y metabolismo de diversos neurotransmisores (Handa & Weiser, 2014); esta afirmación podría explicar, menos parcialmente, la

prevalencia diferencial de los TA por sexo. La progesterona (P4) que se libera durante el ciclo menstrual y la gestación tiene importantes acciones sobre la neurotransmisión GABAérgica; además, su metabolito alopregnanolona modula la actividad del receptor GABA_A, contribuyendo así a mejorar el tono inhibitor evocado por GABA (Arenas & Puigcerver, 2009). A su vez, el E₂ promueve la producción de 5-HT y NA, ya que actúa sobre las enzimas que limitan la síntesis de esos neurotransmisores, y reduce la actividad de la monoaminoxidasa (MAO), enzima que degrada a las monoaminas en la neurona presináptica. Por sus acciones genómicas, el E₂ podría participar en la síntesis de proteínas que conforman a los receptores y transportadores para 5-HT y NA (Marin, Guerra, Alonso, Ramirez, & Diaz, 2005).

1.4 Tratamientos ansiolíticos

En 1903 se introdujo el uso de barbitúricos para tratar los síntomas de ansiedad, aunque actualmente su uso se ve limitado porque inducen un efecto sedante y pueden producir anestesia o incluso la muerte a dosis altas (Khanna, Kalant, Chau, & Shah, 1998).

Posteriormente, en 1950, se utilizó por primera vez el meprobamato, un fármaco no barbitúrico, para tratar exclusivamente los síntomas de ansiedad; sin embargo, producía farmacodependencia y otros efectos adversos sobre el SNC (Mounier et al., 2012). En los años 60 la talidomida se comercializó como sedante para casos severos de ansiedad; no obstante, se retiró del mercado debido a que produjo anomalías en los espermatozoides y malformaciones congénitas (Ordi-Ros & Cosiglio, 2014). Actualmente existen diversos fármacos para tratar la ansiedad (Cuadro 3); sin embargo, algunos de ellos son eficaces sólo para trastornos específicos y su administración conlleva efectos adversos, lo cual limita su uso generalizado. La elección del tratamiento depende del tipo de TA, la edad de la paciente y el balance entre los efectos terapéuticos y adversos.

Cuadro 3. Fármacos con efecto ansiolítico				
Fármacos	Acción	Los más utilizados	Uso	Desventajas
Benzodiazepinas	Sobre sistema GABAérgico	Clordiazepóxido (Librium) y Diazepam (Valium)	TAG	Dependencia, tolerancia, sedación y deterioro psicomotor
Antidepresivos tricíclicos	Inhibe la recaptura de 5-HT/NA	Imipramina	Trastorno de Pánico y Trastorno Obsesivo-Compulsivo	Necesitan un periodo de 3-5 semanas para inducir efectos sobre la ansiedad.
	Inhibe la recaptura de 5-HT	Clorimipramina		
	Inhibe preferentemente la recaptura de NA	Desipramina	TAG	
IMAOs	Inhiben la MAO	Fenelzina y Moclobemida	Ansiedad	Hipotensión ortostática y, en combinación con tiramina, crisis hipertensivas.
Azapironas	Agonistas de los receptores 5-HT _{1A}	Buspirona		Poca eficacia en la mayoría de los casos
Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRSs)	Inhiben la recaptura de 5-HT	Fluoxetina, sertralina y citalopram	TAG, TOC y ansiedad comórbida con depresión.	Constipación, mioclonías, náuseas y alteraciones de la función sexual (anorgasmia y disfunción eréctil).

5-HT, serotonina; NA, noradrenalina; TAG, Trastorno de Ansiedad Generalizada; MAO, monoaminoxidasa; TOC, Trastorno Obsesivo-Compulsivo. Información recuperada de Argyropoulos, Sandford, & Nutt 2000, Heinze 2003, Kahn et al. 1986, Rudolph et al. 1999, Starcevic 2012, Tallman, Casella & Kehne 2002.

También existen estrategias no farmacológicas para tratar la ansiedad (Cuadro 4), como las técnicas de relajación y la psicoterapia, cuya probabilidad de éxito aumenta si se acompañan de un tratamiento farmacológico, además de que reducen el riesgo de recaídas. Por otra parte, se ha demostrado la eficacia de tratamientos farmacológicos que involucran agentes hormonales para atenuar los síntomas ansiosos del síndrome premenstrual, de la menopausia, postmenopausia y del climaterio en general. También se ha observado un efecto benéfico en los trastornos de ansiedad que cursan con depresión, principalmente en mujeres con

menopausia (Freeman, Sammel, Lin, & Nelson, 2006; Soares & Zitek, 2008). Sin embargo, este tipo de fármacos también produce efectos adversos, especialmente si se utilizan de manera crónica (Lugones, 2006). Aunque los estrógenos son útiles en distintos padecimientos, su uso durante la menopausia ofrece beneficios adicionales sobre el metabolismo, la constitución del hueso, la regulación de temperatura y sobre el sistema cardiovascular, ya que sustituyen a los estrógenos naturales que se pierden con el envejecimiento de la mujer.

Cuadro 4. Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la ansiedad		
Psicoterapia	Farmacológicos	Tratamientos alternativos
*Técnicas de relajación	*Benzodiacepinas: loracepam, diazepam,	*Acupuntura
*Técnicas psicoanalíticas	alprazolam, etc.	*Fitofármacos
*Hipnosis	*Antidepresivos con propiedades ansiolíticas,	*Progesterona
*Bio-feedback	como los tricíclicos (imipramina,	*TRH con estrógenos conjugados y 17β-estradiol.
*Terapia cognitivo-conductual	desipramina) y los ISRS (fluoxetina, paroxetina, sertralina).	
*Manejo de la ansiedad	* Azapironas: buspirona.	

ISRS, inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina; TRH, terapia de restitución hormonal. Información tomada de Salomon et al. 2012, Yabur 2006.

Capítulo 2. ENDOCRINOLOGÍA DE LA MUJER

El sistema endocrino u hormonal regula las funciones metabólicas del organismo a través de la liberación de hormonas. Las glándulas secretan hormonas al torrente sanguíneo para que se transporten hasta llegar a la célula blanco en la que ejercerán su efecto (Neal-Perry, Nejat, & Dicken, 2010). Existen hormonas formadas de diversos compuestos químicos como los péptidos y los esteroides. Las hormonas de naturaleza peptídica se unen a receptores localizados sobre la membrana de la célula blanco y sus efectos están mediados por la activación de segundos mensajeros. En cambio, los esteroides activan receptores citoplasmáticos, ya que sus propiedades liposolubles le permiten difundir a través de la membrana. De esta forma el complejo hormona-receptor se trasloca al núcleo, en donde estimula o reprime la transcripción de genes. Las hormonas que se sintetizan en los órganos sexuales (ovarios y testículos) se denominan hormonas sexuales, las principales hormonales sexuales de la mujer son los estrógenos y la progesterona (P4).

Los esteroides sexuales se liberan de forma cíclica y espontánea a lo largo del ciclo menstrual, cuya duración promedio es de 28 días. Este ciclo está regulado por el hipotálamo, que envía información a la hipófisis anterior, desde la cual se envían señales a los ovarios. Este eje se conoce como Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (HHG) y es susceptible de modificarse con el envejecimiento.

2.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

El hipotálamo, componente central del eje HHG es el enlace entre el sistema nervioso y el endocrino. Esta estructura sintetiza y secreta la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), la cual es transportada hasta la hipófisis anterior o adenohipófisis, en donde estimula la secreción de dos hormonas gonadotróficas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH). Ambas hormonas se liberan al torrente sanguíneo, en donde se unen a proteínas para llegar a sus células blanco en los ovarios (Hall, 2004). La FSH se une a sus receptores de la capa granulosa en los folículos ováricos, contribuyendo al desarrollo folicular y a la síntesis de estrógenos. Por su parte, la LH actúa en sus receptores de las células

de la teca en los folículos maduros, para estimular la liberación de P4 (Duval et al., 2010).

Los ovarios sintetizan tres tipos de estrógenos: 17β -estradiol (E_2), estrona y estriol. El E_2 es el estrógeno más abundante y con acciones más potentes sobre los diferentes órganos y tejidos; durante la pubertad favorece el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios que definen el fenotipo femenino. En etapas posteriores los estrógenos intervienen en la regulación de los ciclos menstruales y en acciones como la ovulación, el desarrollo folicular y del cuerpo lúteo, la producción de moco cervical y, en caso de que exista la fecundación, favorecen el desarrollo de los conductos mamarios y el crecimiento del endometrio (Chirino, Fernandez, Torres, & Navarro, 2004). Por otro lado, la P4 que se libera por el cuerpo lúteo fecundado permite que el producto madure y se mantenga en el útero de la mujer (Barrera, Avila, & Diaz, 2007). En caso de que no haya fecundación, el endometrio se descama y produce un sangrado conocido como menstruación, originando así un nuevo ciclo menstrual.

En ausencia de fecundación, la alta concentración de esteroides sexuales y de inhibina (también sintetizada en los ovarios) regula la inhibición del propio eje mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Figura 1). En esta regulación también participan moduladores supra-hipotalámicos como la 5-HT, la NA, la DA y el glutamato (Brann & Mahesh, 2005).

Cada ciclo menstrual se divide en tres eventos: la fase folicular, la ovulación y la fase lútea. La fase folicular se distingue por concentraciones altas de E_2 , además de ser el periodo en el que se desarrollan los folículos. Al final de esta fase, el folículo primario está listo para ser fecundado, dando inicio a la fase de ovulación. Finalmente, en la fase lútea disminuye la producción de E_2 y aumenta la de P4. Los ciclos menstruales pierden regularidad conforme la mujer madura, ya que aumenta la duración de la fase folicular y, por lo tanto, del ciclo completo (Espey & Richards, 2006). Eventualmente los ciclos menstruales cesan definitivamente, marcando el inicio del envejecimiento reproductivo.

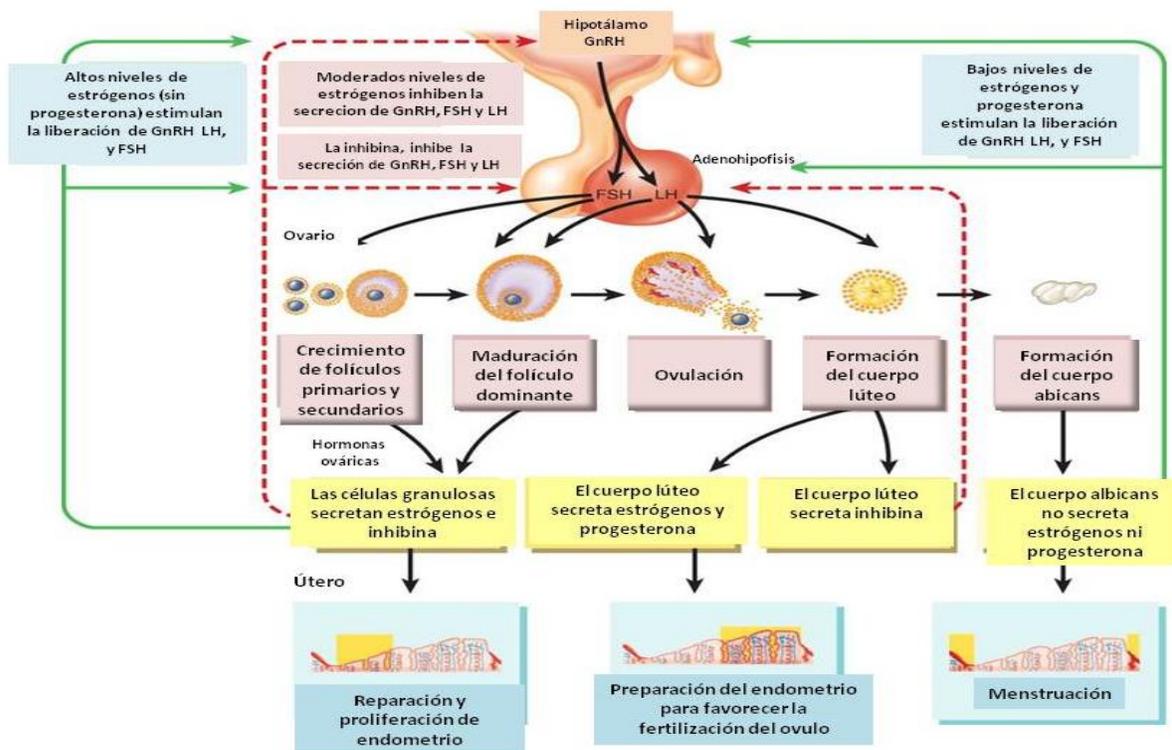


Figura 1. Esquema del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada y su función durante el ciclo menstrual (modificada de Tortora & Derrickson, 2013).

2.2 Perimenopausia, menopausia y postmenopausia

La etapa reproductiva de la mujer inicia con la primera menstruación, llamada menarca, y finaliza alrededor de los 50 años con el último periodo menstrual, denominado menopausia. La menopausia es el último periodo menstrual de la mujer, y se define como el cese permanente de la menstruación que ocurre como resultado de una menor actividad ovárica y que marca el final de la vida reproductiva de la mujer (OMS, 2005).

A partir de la pubertad se distinguen dos etapas en la condición endocrina de la mujer. En la primera, considerada la etapa reproductiva, la menstruación se presenta de manera cíclica a menos que ocurra la fecundación. Aproximadamente 5 ó 10 años antes de la menopausia comienza a presentarse una irregularidad en los ciclos menstruales y además de periodos de amenorrea de 60 días o más, lo que marca la transición a la segunda etapa conocida como perimenopausia o climaterio (Soules et al., 2001), la cual termina un año después de la última

menstruación (Huerta, 2000). Se consideran marcadores hormonales de la perimenopausia los niveles altos de FSH en sangre que se producen en respuesta al envejecimiento ovárico. Este último ocurre antes que el envejecimiento del hipotálamo, el cual, en la madurez libera cantidades elevadas de GnRH, ocasionando un aumento en la concentración de FSH (>40 pg/ml) en un esfuerzo por estimular a los ovarios. Al mismo tiempo, disminuye la producción de prolactina, testosterona y E₂ (<40 pg/ml), pero incrementa la concentración de estrona, lo cual induce un estado fluctuante de estrogenismo. Las cantidades secretadas de estrógenos y P4 resultan insuficientes y poco a poco merma la actividad de los ovarios, hasta llegar a un estado no funcional (Brann & Mahesh, 2005; Soules et al., 2001).

Etapas reproductiva y no reproductiva en la mujer								
Ultimo periodo menstrual								
Etapas:	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2
Terminología:	Reproductiva			Transición a la menopausia		Post menopausia		
	Temprana	Pico	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	
Duración de la etapa:	variable			variable		1 a.	4 años	El resto de la vida
Ciclos menstruales:	variable a Regular	Regular		Variable en la longitud del ciclo (>7 días)	≥ 2 saltos de ciclo y amenorrea (≥60 días)	Amen 12	Nada	
Endocrinología:	FSH normal		↑ FSH	↑ FSH		↑ FSH		

Figura 2. Descripción general de las etapas reproductivas y la no reproductiva de la mujer. Modificado de Soules et al., 2001.

Posterior a la perimenopausia, es decir, un año después de la última menstruación, inicia la postmenopausia (Figura 2), en la que no hay ciclos menstruales, cesa definitivamente la actividad reproductiva y aumenta la concentración de FSH (Figura 3) (Huerta, 2000; Soules et al., 2001).

En la peri- y postmenopausia ocurren alteraciones cardiovasculares, osteoporosis, cambios en el peso corporal y en el ciclo sueño-vigilia (Albert, Broadwell, & Newhose, 2011; Dalbert, 1997), así como bochornos, sudoración, falta

de libido y síntomas psicológicos como depresión y ansiedad, los cuales pueden ser de gravedad variable, dependiendo del historial clínico de cada mujer. Además, las mujeres en edad madura tienen una vulnerabilidad biológica a presentar ansiedad (Estrada-Camarena, Lopez-Rubalcava, Vega-Rivera, Recamier-Carballo, & Fernandez-Guasti, 2010; Soares & Zitek, 2008). Si bien se trata de procesos naturales, la perimenopausia tiene una duración promedio de cinco años y la postmenopausia abarca casi un tercio de la vida de una mujer. Esas condiciones, aunadas a factores como la pérdida de la pareja, la separación de los hijos, la jubilación, el estado socioeconómico y los aspectos culturales (Berlanga & Huerta, 2000), han motivado la búsqueda de alternativas de atención integral que mejoren la calidad de vida de las mujeres que ya no se encuentran en etapa reproductiva.

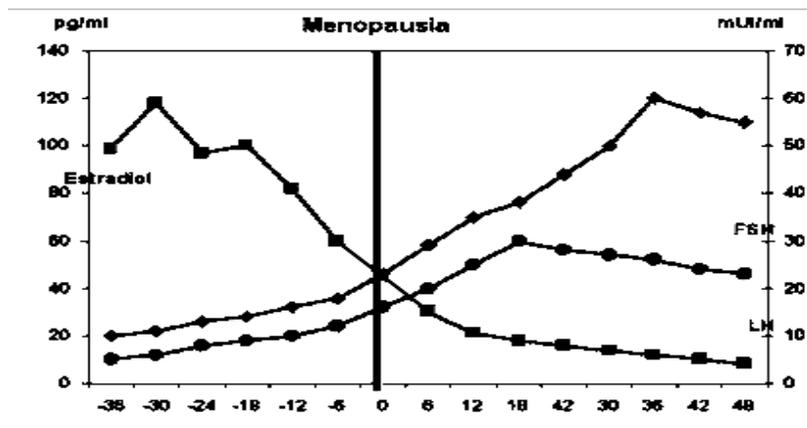


Figura 3. Cambios en los niveles de E₂, FSH y LH durante la menopausia. Tomada de Yabur 2006.

2.3 Terapia de reemplazo hormonal en la menopausia

Las terapias de restitución hormonal (TRH) han sido una de las alternativas más eficientes para tratar los síntomas asociados al envejecimiento del sistema endocrino. Los estrógenos equinos conjugados (EEC), el valerato de estradiol, el 17β-estradiol y el etinil-estradiol administrados por vía intramuscular, oral, o bien en parches, son ampliamente usados como TRH; además, se combinan con progestinas para aumentar su efectividad (Vargas-Hernández, Acosta-Altamirano, Moreno-Eutimio, Vargas-Aguilar, Flores-Barrios, Tovar-Rodríguez, 2013).

Las TRH se pueden utilizar desde una etapa temprana en mujeres histerectomizadas, o durante la perimenopausia y postmenopausia temprana.

Como tratamiento de restitución, estos estrógenos mejoran el metabolismo, la densidad ósea, incrementan la energía y la fuerza muscular y reducen los bochornos. Las mujeres que se encuentran en la transición a la etapa no reproductiva y que han sido tratadas con estrógenos reportan una disminución en los síntomas de ansiedad y depresión. La TRH con E₂ o estrógenos equino conjugados en parches, gel u óvulos, así como la administración de valerato de estradiol por vía oral, solos o en combinación con P4, reducen la ansiedad en mujeres durante el periodo premenstrual y la menopausia (J. E. Rossouw et al., 2002). Estos efectos se han corroborado en diversos estudios experimentales usando ratas ovariectomizadas como modelo de hipogonadismo postquirúrgico (Estrada-Camarena, Fernandez-Guasti, & Lopez-Rubalcava, 2003; Martinez-Mota, Estrada-Camarena, Lopez-Rubalcava, Contreras, & Fernandez-Guasti, 2000; Walf & Frye, 2005; Walf, Paris, & Frye, 2009). A pesar de los beneficios reportados, no todas las mujeres son candidatas para recibir este tratamiento, ya que el consumo prolongado se ha asociado con mayor riesgo de padecer cáncer de mama o de útero (Lugones, 2006). Los estrógenos también aumentan el riesgo de sufrir accidentes cerebrovasculares, ya que poseen efectos procoagulantes (Cushman et al., 2004; Nelson, Humphrey, Nygren, Teutsch, & Allan, 2002; J. Rossouw et al., 2011).

Estudios recientes han mostrado que los efectos de las TRH no son equivalentes en mujeres jóvenes respecto a las de edad más avanzada; en éstas aumenta el riesgo de sangrado y de alteraciones cognitivas, además de que la efectividad del tratamiento podría disminuir (Farquhar, Marjoribanks, Lethaby, Suckling, & Lamberts, 2009). Estudios preclínicos sugieren que el efecto de las TRH se asocia con el tiempo de privación hormonal; concretamente, a mayor tiempo postovariectomía, la eficacia de las TRH disminuye (Moien-Afshari, Kenyon, Choy, Battistini, McManus, Laher & Maturitas, 2003). De acuerdo con esos estudios, la edad de inicio de tratamiento y el tiempo de privación hormonal son factores relevantes para la adecuada respuesta a la TRH (Warren, 2007).

Capítulo 3. CICLO ESTRAL DE LA RATA Y ENVEJECIMIENTO

Los roedores, particularmente las ratas, han sido el modelo más utilizado para estudiar el sistema endocrino y el envejecimiento fisiológico de la mujer; su amplio uso se atribuye a la semejanza en la regulación del ciclo reproductivo, bajo control hipotalámico y de ovulación espontánea, además de la similitud de la sintomatología del envejecimiento endocrino tanto a nivel fisiológico como conductual (Neal-Perry et al., 2010).

La vida reproductiva de la rata comprende de los 3 a los 12-14 meses de edad, dependiendo de la cepa. A nivel endocrino se caracteriza por ciclos estrales (de *estrus*: frenesí) regulares con una duración de 4-5 días (Marcondes, Miguel, Melo, & Spadari-Bratfisch, 2001) que se encuentra bajo el control del HHG. Cada ciclo comprende 4 fases: metaestro (también llamado diestro I), diestro (o diestro II), proestro y estro. Las fases se distinguen fácilmente mediante la observación al microscopio de las células epiteliales y los leucocitos presentes en muestras de frotis vaginales (Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti, 2011).

Las oscilaciones hormonales del ciclo estral se presentan de la siguiente manera: la P4 aumenta en la fase de metaestro disminuye casi a niveles basales en el diestro, aumenta nuevamente hasta alcanzar sus niveles máximos en el proestro y finalmente disminuye al inicio del estro y aumenta nuevamente al final del mismo. Por su parte, el E₂ tiene una concentración baja durante el metaestro; comienza a aumentar al final del diestro alcanza su pico durante el proestro (al igual que la P4); disminuye al final de éste y regresa a sus niveles más bajos durante el estro, dando inicio a un nuevo ciclo (Figura 4). La ovulación en las ratas tiene lugar en el proestro, cuando los niveles de E₂ y P4 son más altos, y coincide con el estro conductual o celo. Sin embargo, existen diferencias en las oscilaciones hormonales respecto al ciclo menstrual, ya que en la mujer existen dos fases más definidas: la folicular, en la que predominan los estrógenos, y la lútea, en la que predomina la P4.

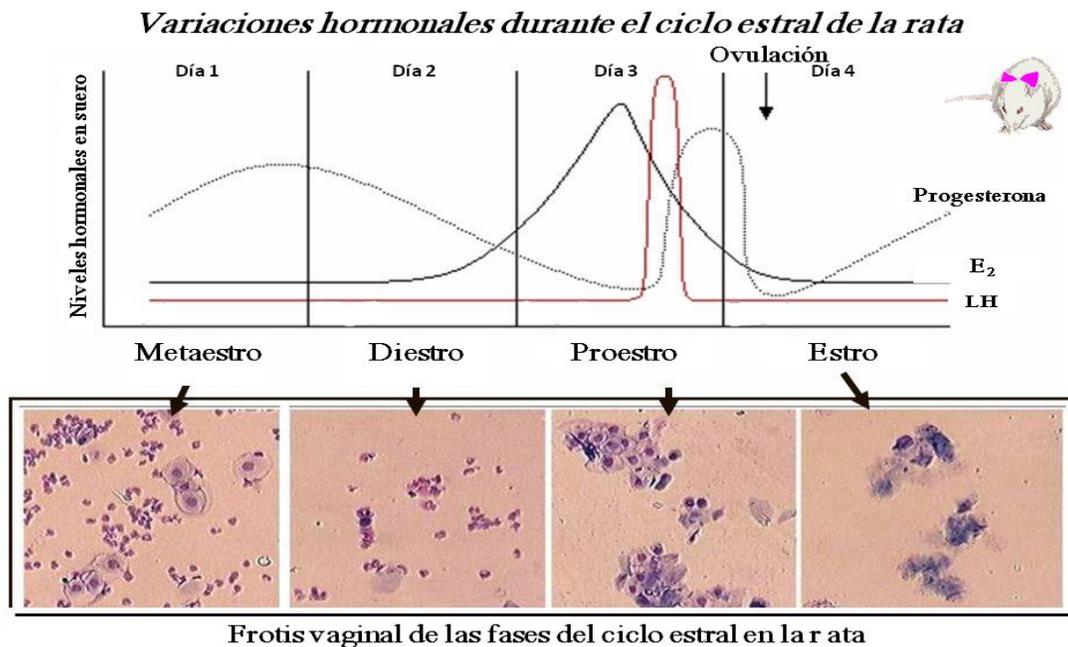


Figura 4. Niveles de P4, E₂ y hormona luteinizante (LH) a lo largo del ciclo estral de la rata (Modificado de Henrique Pinto 2007).

La vida no reproductiva de la rata se puede dividir en tres etapas (Figura 5): la primera inicia alrededor de los 12-15 meses de edad y corresponde a la etapa de ciclos irregulares (Flores-Ramos & Martínez-Mota, 2012), subsecuentes a cambios bruscos en la liberación de LH, FSH, estrógenos y P4. Esta etapa es equivalente a la perimenopausia de las mujeres, en la cual aumenta la producción de FSH, disminuye la de inhibina y se alteran las concentraciones de los estrógenos (Neal-Perry et al., 2010). También se caracteriza por ciclos estrales más largos y una baja producción folicular que puede durar varios meses. La segunda etapa se conoce como estro constante por su citología vaginal; tiene una duración muy corta y es el resultado de los niveles altos de estrógenos. Esta fase no se presenta en las mujeres; de hecho éstas presentan un declive en la concentración de hormonas sexuales. Finalmente, el diestro persistente involucra el resto de la vida del animal; en esta etapa se pierde toda función ovárica por lo que es equivalente a la postmenopausia en las mujeres (Lu, Hopper, Vargo, & Yen, 1979).

Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti (2011) reportaron que la mayoría de las ratas hembra de 10 y 11 meses de edad de la cepa Wistar permanecen en la fase de ciclos irregulares (77-82%), en diestro persistente solo se encuentran del 9

al 12%. El porcentaje de ratas en ciclos irregulares disminuye a los 12-14 meses de edad (69-72%), mientras que el de ratas en diestro persistente aumenta (21-28%). Sin embargo, no se modifica la proporción de ratas en fase de estro constante y ciclos regulares desde los 10 a los 14 meses, que permanece debajo del 10%. Los datos muestran que alrededor de los 14 meses inicia el declive en la función del eje HHG en la mayoría de esa población.

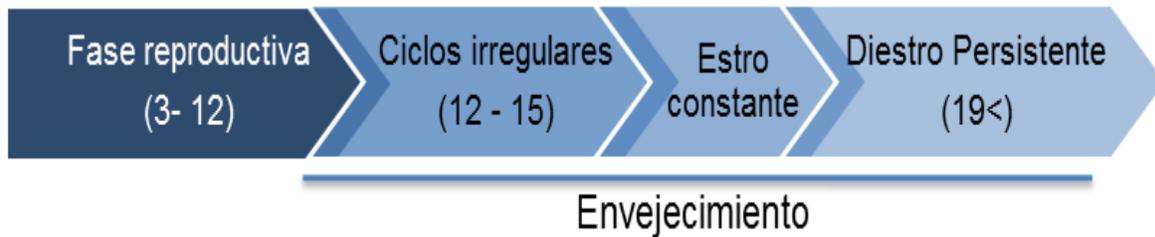


Figura 5: Esquema temporal de la fase reproductiva y las no reproductivas de la rata.

A diferencia de las mujeres, las ratas pierden su función reproductiva desde la fase de ciclos irregulares; sin embargo, al igual que ellas, manifiestan mayores conductas de ansiedad y depresión durante la transición de la vida reproductiva a la no reproductiva (Walf & Frye, 2010; Walf, Koonce, Manley, & Frye, 2009). Las ratas envejecidas también experimentan cambios en la sensibilidad a los fármacos psicoactivos. Por ejemplo, el diazepam pierde su acción ansiolítica en ratas hembra de mediana edad, pero aumenta su efecto sobre tiempo de reacción en la prueba de enterramiento defensivo, que se interpreta como un efecto sedante (Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti, 2011). Esas variaciones sugieren que los cambios en las hormonas sexuales, principalmente de estrógenos, repercuten en los sistemas de neurotransmisión que son blanco de fármacos psicoactivos.

La investigación sobre el envejecimiento en roedores requiere de una gran cantidad de tiempo y de cuidados especiales para la manutención de los animales; por tal razón, se han utilizado modelos más prácticos como la ovariectomía (Ovx), que consiste en la extirpación quirúrgica de los ovarios para eliminar la principal fuente de estrógenos. La Ovx semeja a la menopausia en algunos aspectos, por ejemplo, en alteraciones conductuales en pruebas de depresión y de ansiedad, pérdida de masa ósea y disminución de la conducta sexual (Estrada-Camarena et

al., 2003; Walf, Rhodes, & Frye, 2004). No obstante, se debe subrayar que no son organismos envejecidos, por lo que recientemente ha cobrado importancia el estudio de agentes terapéuticos en modelos animales de envejecimiento como las ratas de mediana edad (14-16 meses) o senescentes (22 meses).

Capítulo 4. ESTRÓGENOS

La composición química de los estrógenos comprende 18 carbonos, que contienen un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo OH en el carbono 3), y un grupo β -OH o cetona en la posición 17 del anillo D, lo que le confiere la estructura característica para la unión a sus receptores (Brunton, Chabner, & Knollman, 2012).

Los estrógenos ejercen su acción por medio de dos mecanismos: no genómico y genómico. El primero involucra segundos mensajeros que se activan cuando los estrógenos se unen a sus receptores de membrana en órganos blanco como el útero y los ovarios. En contraste, en el mecanismo genómico los estrógenos se unen directamente a sus receptores intracelulares para modular la expresión de genes. Los estrógenos son hormonas de carácter lipídico, por lo que difunden fácilmente a través de la membrana celular para unirse a sus receptores del citoplasma. El complejo esteroide-receptor interactúa con secuencias específicas de nucleótidos en el ADN denominadas elementos de respuesta a estrógenos, que se encuentran en genes específicos, por lo que el efecto es más tardado en comparación con el no genómico. En otras palabras, las hormonas modulan la transcripción de genes y la síntesis de proteínas, por medio del mecanismo de acción genómico (Loose & Stancel, 2006).

Existen dos subtipos de receptores a estrógenos (RE), los alfa (α) y los beta (β). Los primeros (RE α) se localizan principalmente en el útero, hígado, riñones, sistema cardiovascular y huesos, aunque también se han encontrado en la hipófisis y en células de la teca de ratas. Los RE β se encuentran frecuentemente en el timo, estómago, intestino delgado, duodeno y huesos. Las acciones de los estrógenos sobre uno y otro receptor son independientes, aunque la estimulación de los RE β puede modular los efectos producidos por la activación de los RE α (Harris, Katzenellenbogen, & Katzenellenbogen, 2002; Locia, Soto, Manzo, & Hernandez, 2008).

Los RE se expresan diferencialmente, de acuerdo al subtipo de RE (Cuadro 5), en estructuras como ganglios basales, tallo cerebral y *locus coeruleus* (Berlanga & Huerta, 2000).

Cuadro 5. Expresión de los RE en áreas cerebrales		
Receptores α	Receptores β	Receptores α y β
Rafé medio	Núcleo geniculado	Amígdala
Hipotálamo	Adenohipófisis	(medial/cortical)
Región caudal del tallo	Área preóptica	Área preóptica
Núcleo arcuato	Estría terminal	Núcleo basal de la estría terminal
Región telecefálica	Amígdala	Cerebelo
Regiones CA-1 y CA-3	Lactotropos	<i>Locus coeruleus</i>
Neuronas GnRH	Hipocampo	Hipocampo
Astas dorsales	Astas dorsales	Hipotálamo
Órgano subfornical	Cerebelo	Núcleo del tracto solitario
Núcleo ventromedial del hipotálamo	Bulbo olfatorio	<i>Septum</i>
	Núcleo supraóptico	
	Área tegmental ventral	
	Núcleo paraventricular hipotalámico	
	Rafé dorsal	

Información recuperada de Locia et al. (2008); Weiser, Foradori, & Handa (2008).

4.1 Efecto de los estrógenos en el SNC

Los estrógenos producen cambios funcionales y estructurales en el SNC. Por ejemplo, intervienen en la excitabilidad neuronal y en la modulación de sistemas de neurotransmisión, ya que participan en la síntesis, metabolismo, y recaptura de diferentes neurotransmisores. Estudios de restitución hormonal en ratas Ovx muestran que los estrógenos favorecen la neurogénesis, es decir, la formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto, así como el crecimiento de dendritas, lo cual aumenta los puntos de contacto entre las células (Nissen et al., 2012). De esta manera, los estrógenos contribuyen a la plasticidad neuronal, a la respuesta al estrés y a la regulación de las emociones y del estado de ánimo (Jensvold, 1995; Walf & Frye, 2010).

Los estrógenos participan en la etiología de diversos trastornos mentales, como los de ansiedad y la depresión, como la indican varias investigaciones preclínicas. Por ejemplo, se ha mostrado que las ratas hembra con mayores concentraciones de E₂ y P4 exhiben menos conductas de ansiedad en varias

pruebas sensibles a fármacos ansiolíticos (Frye, Walf, & Paris, 2010; Walf, Koonce, et al., 2009) además, la Ovx favorece la aparición de conductas de ansiedad y depresión en ratas y ratones hembra (Frye & Walf, 2004). El tratamiento con diferentes estrógenos como el benzoato de estradiol y el E₂ reduce las conductas de ansiedad en ratas hembra adultas (Walf & Frye, 2006, 2009). De forma interesante Walf y Frye en 2005 reportaron que es posible que el efecto ansiolítico del E₂ esté mediado por cambios en la actividad del eje del estrés, conocido como eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA). Estas autoras encontraron que el E₂ produce un efecto ansiolítico con un patrón de curva en U, es decir, efectivo en dosis intermedias (10-20 µg/kg) pero no en dosis bajas o altas (1-5 µg/kg, o 50 µg/kg, respectivamente). De forma paralela únicamente las dosis intermedias redujeron la concentración plasmática de corticosterona, el principal mediador del estrés, mientras que la dosis más alta de E₂ la exacerbó con respecto al grupo control. Por lo tanto, es posible que la adecuada modulación del eje del estrés pudiera subyacer al efecto ansiolítico de E₂. Dicha modulación podría compararse a la de mujeres expuestas a pruebas psicométricas como estímulos estresantes, ya que aquellas que regulan mejor el estrés y tienen niveles moderados de estrógenos presentan menores respuestas de ansiedad (Altemus et al., 2001; Sibolboro Mezzacappa, Tu, & Myers, 2003).

4.2 17 β –Aminoestrógeno prolame

Los 17 β -aminoestrógenos (AEs) son hormonas sintéticas derivadas de la estrona. Su estructura química es similar a la del E₂ (Figura 6); la diferencia radica en que poseen un grupo amino (NH) en el carbono 17 unido a una cadena que puede variar de 3-6 carbonos (Fernandez G, Rubio-Arroyo, Soriano-Garcia, Toscano, & Perez-Cesar, 1985; Lemini, Franco, Avila, & Jaimez, 2005a).

Este cambio en la estructura química les confiere actividad anticoagulante, contraria a la procoagulante del E₂ y de otros estrógenos ampliamente utilizados para las TRH, como los EEC y el valerato de E₂ (Jaimez et al., 2000; Lemini et al., 2005a; Lemus et al., 1998).

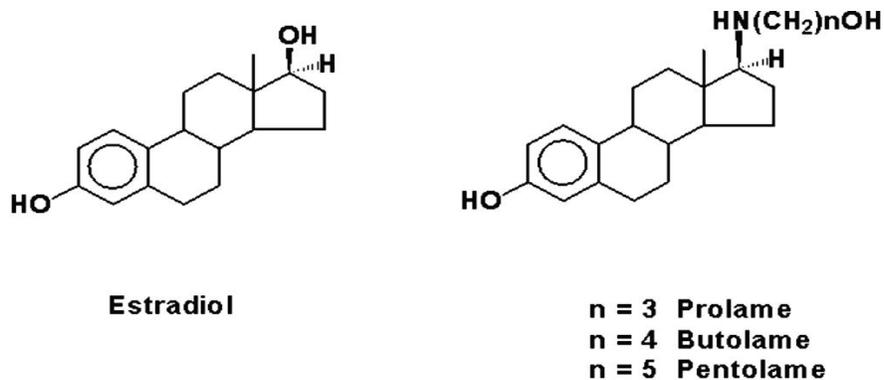


Figura 6: Estructura química del E₂ y los 17β-AE. Tomada de Lemini et al. (2016).

Al respecto, Lemini et al. (2005a), compararon el tiempo de coagulación en ratones hembra adultas jóvenes ovariectomizadas (AJ-Ovx) tratadas de manera aguda con E₂, prolame, butolame o pentolame (20-80 µg/kg). Encontraron que el E₂ redujo el tiempo de coagulación de un 10 a 25% mientras que los AEs lo aumentaron de un 12 a 48%. En el mismo trabajo se reportaron resultados similares en ratas macho cuando los tratamientos se administraron en dosis altas y mediante un esquema subcrónico (5 días, 1000 µg/animal/ día).

En ratas hembra Ovx se ha encontrado que el tratamiento por 5 días de los AEs prolame y butolame (1-1000 µg/rata) produce importantes efectos anticoagulantes (Figura 7). La dosis media efectiva (IC₅₀) del butolame fue de 5.4 ± 0.65 µg/rata, mientras que la de prolame fue de 66.6 ± 2.57, por lo que butolame mostró más potente para incrementar el tiempo de coagulación. E₂ produjo los efectos opuestos sobre el tiempo de coagulación (Jaimez et al., 2000).

El prolame [17β-(3-hidroxy-1-propylamino)-1.3.5(10)-(estratrien-3-ol)] ha sido el AE más estudiado en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Sus acciones sobre la transcripción están mediadas por la interacción con los REα y REβ, una característica que comparte con el E₂. La afinidad de prolame es similar para ambos subtipos, mientras que otros AEs de la serie, como butolame o pentolame, tienen mayor afinidad por los REα (Jaimez et al., 2000).

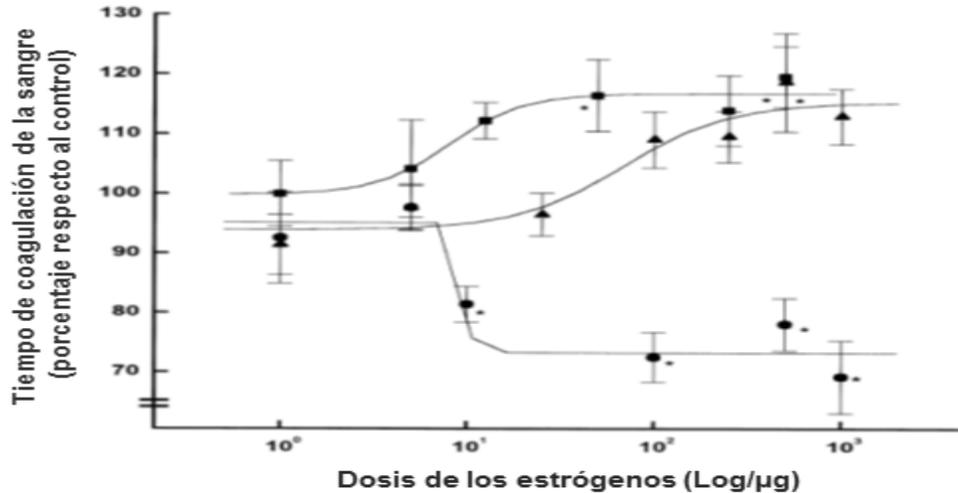


Figura 7. Efecto de prolame (▲), butolame (■) y E₂ (●) en el tiempo de coagulación de la sangre. Las ratas hembra, fueron tratadas con los estrógenos 20 días después de la Ovx. Los tratamientos fueron aplicados por 5 días, por vía s.c. La evaluación se realizó a las 24 h de la última administración.

Prolame produce efectos estrogénicos en el tejido uterino. Lemini, Franco, Avila, & Jaimez (2005b) reportaron que este AE aumenta de forma dependiente de la dosis el peso uterino de ratas o ratones hembra Ovx. Este efecto se ha observado con tratamientos agudos y sub-crónico (tres administraciones), en un rango de 0.01 a 1000 μg/kg; en todos los casos se necesitó una dosis mayor que la de E₂ para aumentar el peso del útero. Lo anterior se ha replicado con otros compuestos de la serie (Jaimez et al., 2000; Lemini et al., 2005b), sugiriendo que los AE tienen menor potencia estrogénica en útero que el E₂.

Con respecto a los efectos centrales, se ha demostrado que la administración de prolame durante tres días produce efectos antidepresivos en ratas hembra de 4 meses de edad con supresión hormonal por Ovx (Lemini et al., 2013). El efecto es similar al de E₂, aunque se necesitó el doble de dosis (20 μg/rata) para producir el mismo efecto del estrógeno natural. Además, las acciones de ambos compuestos sobre la conducta depresiva fueron completamente bloqueadas por tamoxifeno, un antagonista inespecífico de los RE, indicando que éstos participan en el efecto antidepresivo de prolame (Lemini et al., 2013).

Por otro lado, el tratamiento crónico (26 días) con prolame a dosis de 60μg/kg produce efectos ansiolíticos en ratas hembras AJ-Ovx evaluadas en la prueba de

laberinto elevado en cruz, un modelo animal de ansiedad (Lemini et al., 2016; Nissen et al., 2012). También se ha evidenciado que el prolame produce efectos en la cognición, ya que mejora la navegación de ratas en la prueba del laberinto de Morris (Nissen et al., 2012), que evalúa la memoria espacial dependiente de hipocampo. En suma, prolame tiene un efecto equivalente al de E₂ en pruebas de ansiedad, depresión y memoria en ratas jóvenes con hipoestrogenismo.

A la fecha no se ha estudiado el posible efecto ansiolítico de prolame en modelos de envejecimiento con pérdida natural de hormonas sexuales. Las ratas de mediana edad presentan esas condiciones y, por lo tanto, son un modelo adecuado para estudiar los efectos del prolame en una población que se caracteriza por el envejecimiento ovárico.

Capítulo 5. MODELOS ANIMALES

La investigación preclínica de los trastornos afectivos se apoya en modelos experimentales con animales de laboratorio. Los modelos animales se han estandarizado para reflejar una condición humana susceptible de modificación por intervenciones farmacológicas de uso clínico o experimental; sin embargo, sólo se puede observar el aspecto somático y la conducta de una condición específica. Gomez, Saldivar, & Rodriguez (2002) señalaron que los modelos animales deben evaluar el potencial terapéutico de fármacos utilizados en el tratamiento del trastorno en cuestión; además, amplían el espectro indicando que los modelos deben contribuir a conocimiento de los mecanismos de acción de dichos fármacos y a la determinación de los sustratos neurobiológicos del trastorno.

5.1 Modelos animales de ansiedad

Clínicamente la ansiedad se define como la respuesta emocional del miedo anticipado ante futuras amenazas, que pueden ser o no reales, con síntomas y cambios fisiológicos bien identificados. Los modelos animales de ansiedad son simplificaciones del trastorno humano, el cual es mucho más complejo. Permiten la simulación de un número limitado de signos y, a falta de la descripción subjetiva de las emociones que ocurre en el humano, su validez se sustenta en mediciones fisiológicas, neuroquímicas y conductuales características de la ansiedad, los cuales pueden revertirse con fármacos ansiolíticos clínicamente efectivos (Koob, Heinrichs & Britton, 1998; Smith & Nutt, 1996).

Cualquier modelo animal debe cumplir con ciertos criterios de confiabilidad y validez (Cuadro 6) que evalúan la utilidad y valor científico de la información que proporciona.

Los modelos animales de ansiedad se clasifican en condicionados y no condicionados. Los primeros requieren de un entrenamiento que involucra dos eventos: uno adverso, denominado estímulo no condicionado (por ejemplo, un choque eléctrico), que se acopla a un segundo evento, denominado estímulo

condicionado, como un tono o una luz. Después de uno o varios entrenamientos, el animal desarrolla conductas que indican ansiedad cuando se les presenta el estímulo condicionado (Gomez et al., 2002; Koob, 1998). En estos modelos se controlan las variables del experimento para obtener las conductas deseadas; sin embargo, el proceso del modelado involucra centros cerebrales asociados a la memoria y el aprendizaje, por lo que la conducta final no refleja una respuesta espontánea.

Cuadro 6. Criterios de confiabilidad y validez de los modelos animales	
Validez	Descripción
Predictiva	Se determina por la respuesta farmacológica a los tratamientos clínicamente efectivos. Los modelos de ansiedad deben ser sensibles a los fármacos ansiolíticos, con resultados observables a nivel fisiológico.
De apariencia	Se define como la similitud fenomenológica y conductual entre lo que se observa con el modelo y los síntomas del trastorno a nivel clínico.
Convergente	Es el grado de correlación de un modelo con otros que miden el mismo trastorno de ansiedad.
Etiológica	Se refiere a que la etiología del trastorno clínico pueda explicar el origen de las alteraciones conductuales en el modelo animal.

Cuadro 6. Descripción tomada de Koob (1998).

Por su parte, los modelos animales de ansiedad de tipo no condicionado se apoyan en las respuestas innatas del animal ante estímulos adversos, que no necesitan un entrenamiento previo. Los estímulos pueden ser: a) similares a los naturales, como los espacios novedosos e intensamente iluminados, el enfrentamiento con individuos dominantes de su misma especie o predadores naturales, y b) adaptaciones de estímulos naturales, como choques eléctricos de baja intensidad. Considerando esta clasificación, tanto el modelo de Laberinto Elevado en Cruz (LEC) como la prueba de Enterramiento Defensivo (ED), se consideran modelos no condicionados (De Boer & Koolhaas, 2003; Rodgers, Cao, Dalvi, & Holmes, 1997).

5.1.1 Laberinto elevado en cruz

Es un modelo descrito y validado por (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985) desde 1984-1985. Se basa en la exploración y la respuesta de temor que muestran los roedores ante los espacios abiertos (Treit, Menard, & Royan, 1993), que incluye la



Figura 8. Dispositivo de la prueba de LEC (Pellow et al., 1985). De manera natural, los roedores tienden a permanecer en los brazos cerrados, ya que los brazos abiertos representan un estímulo adverso que reduce la permanencia y el número de entradas a éstos. Los tratamientos ansiolíticos que se utilizan en la clínica, como benzodiazepinas, antidepresivos tricíclicos y diferentes estrógenos, aumentan en el roedor el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (TBA) y también el número de entradas a éstos (ver Cuadro 7). Hormonas como las progestinas producen efectos similares.

Cuadro 7. Efecto de ansiolíticos y diferentes factores hormonales sobre el TBA			
Referencias	Cepa y condiciones endocrinas	Tratamientos	Resultado
Bitran, Hilvers, & Kellogg, (1991)	Long-Evans, en diestro, proestro y Ovx	/	Ovx > diestro = proestro
Fernandez-Guasti, Martinez-Mota, Estrada-Camarena, Contreras, & Lopez-Rubalcava, (1999)	Wistar, Ovx e intactas	DMI por 21-26 días (2.5 mg/kg)	↑- DMI (Ovx)
Walf & Frye, (2010)	Long Evans, Ovx.	E ₂ (0.9 mg/kg), raloxifeno (1 mg/kg) ó E ₂ + raloxifeno	↑-E ₂ ↑-raloxifeno
Nissen et al., (2012)	Wistar, Ovx e intactas.	Prolame (60 µg/kg) ó E ₂ (50 µg/kg), durante un mes.	↑-Prolame ↑-E ₂

Cuadro 7. Todos los estudios fueron realizados en ratas hembra de 2-4 meses de edad. Simbología: > mayor que, = igual que, ↑ aumento. Abreviaturas: TBA, tiempo de permanencia en brazos abiertos; LEC laberinto elevado en cruz; Ovx, ovariectomía; E₂, estradiol; DMI, desipramina.

El LEC se considera un modelo de agorafobia y ansiedad generalizada, con base en la respuesta a fármacos. Dado que el modelo requiere de la activación motora de los animales, se han implementado medidas para descartar efectos inespecíficos, por ejemplo, el número de cruces en el laberinto (# C), es decir, la cantidad de entradas o salidas a cualquiera de los cuatro brazos, y la latencia de entrada que indica el tiempo que tarda el roedor desde que se coloca en el centro del laberinto al iniciar la evaluación, hasta que entra a cualquiera de los cuatro brazos.

5.1.2 Enterramiento defensivo

Es una prueba propuesta por (Pinel & Treit, 1978), basada en la conducta innata de los roedores para defenderse de algún estímulo que les produce temor, por ejemplo, la presencia de depredadores (De Boer & Koolhaas, 2003). La conducta de enterramiento consiste en el



desplazamiento del material de cama (tierra, hojarasca, aserrín, entre otros) hacia el estímulo adverso; el material se moviliza con las patas delanteras o con la cabeza del roedor, por lo que el enterramiento se considera una conducta defensiva (Figura 9). Se ha propuesto que este modelo refleja un estado de ansiedad generalizada, ya que las benzodiacepinas y algunos antidepresivos reducen la conducta de enterramiento (ver Cuadro 8). Algunas hormonas esteroides como las progestinas o la testosterona también reducen el tiempo de enterramiento, mientras la mayoría de los estrógenos administrados de forma exógena tienen menor eficacia que las progestinas para reducir la conducta tipo ansiedad en este modelo (Fernandez-Guasti, Fiedler, Herrera, & Handa, 2012; Fernandez-Guasti et al., 1999).

La prueba de ED consiste en colocar al animal en una caja de acrílico transparente con aserrín u otro material como cama. En una de las paredes se encuentra adherido un electrodo conectado a un estimulador de corriente constante que emite choques eléctricos al contacto (se recomienda de 0.03-1 mA). La

respuesta al choque eléctrico varía dependiendo de la intensidad del choque, así como al material de cama y la altura de ésta (De Boer & Koolhaas, 2003). El tiempo invertido en la conducta de enterramiento (TE) es un indicador directo de los niveles de ansiedad, mientras la latencia de enterramiento (LE) indica la capacidad de respuesta del animal ante el estímulo adverso. Se espera que un fármaco ansiolítico reduzca la conducta de enterramiento sin modificar el tiempo de reacción al estímulo; sin embargo, éste también puede aumentar con dosis altas de ansiolíticos. En tal caso, se considera que dicha dosis produce un efecto sedante (Koob et al., 1998).

Cuadro 8. Efecto de ansiolíticos y diferentes factores hormonales en la prueba de ED								
Referencia	Cepa y condición	Tratamiento	Resultados					
			TE	L	% AE	TF	TG	#ch
Fernandez-Guasti et al. (1999)	♀ Wistar Ovx e intactas	Tx crónico 21 días Desipramina (2.5 mg/kg)	↓-Ovx	↑-Ovx ↑-proestro ↑-estro	↓-proestro	-	-	-
Rogel-Salazar & Lopez-Rubalcava, (2011)	♂Wistar vs Wistar Kyoto (WKY).	/	WKY < Wistar	-	-	WKY > Wistar	WKY > Wistar	-
		Clomipramina (0, 0.6, 2.5 ó 5 mg/kg) ó 8-OH-DPAT (0.06 mg/kg).	↓dependiente de la dosis	-	-	-	-	-
Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti, (2011)	Wistar ♀, en ciclos irregulares o diestro persistente y	Tx crónico clomipramina (0.6 mg/kg) y 8-OH-DPAT (0.03 mg/kg).	↓ Wistar < WKY	-	↑ Wistar	↑ Wistar	-	-
	/	/	♀ > ♂	♀ < ♂	-	♀ > ♂	-	-
	♂ De 10-14 meses.	Diazepam 0.5 o 1.0 mg/kg	-	↑-♀	-	-	-	-

Cuadro 8. Todos los estudios fueron realizados en ratas. Simbología: ♀ hembra, ♂ macho > mayor que, < menor que, ↓ reducción, ↑ aumento. Abreviaturas: TE, tiempo de enterramiento; L, latencia de enterramiento; % AE, Porcentaje de animales que expresó la conducta de enterramiento; TF, tiempo de *freezing*; TG, tiempo de *grooming*, # CH, número de choques, WKY, Wistar-Kyoto.

Además del enterramiento, los roedores despliegan estrategias de afrontamiento que involucran conductas pasivas como el *freezing* (el animal

permanece sin realizar movimiento alguno) y la inmovilidad (presenta movimientos laterales de cabeza, lo que indica un estado de alerta) (Lopes, Azevedo, Imbiriba, Freire, Valença, Caldirola, Perna & Nardi 2009) o bien expresiones activas, como el *grooming* (un patrón de acicalamiento céfalo-caudal característico de ratas estresadas) o las aproximaciones al electrodo (Kalueff & Tuohimaa, 2005), que predominan en algunas cepas de roedores.

III. Planteamiento del problema

Prolame es un AE que produce efectos ansiolíticos en ratas hembra adultas jóvenes con hipoestrogenismo inducido por ovariectomía. La similitud de sus efectos ansiolíticos con los del estrógeno natural 17β -estradiol (E_2) le confiere el potencial de ser usado como una TRH con acciones centrales. Por otro lado, el prolame produce efectos sobre parámetros sanguíneos, celulares y conductuales, con menor potencia respecto al E_2 , sugiriendo que podría producir efectos adversos de menor gravedad en tejidos sensibles a estrógenos, como el uterino.

La población blanco para las TRH son las mujeres maduras con síntomas somáticos y psiquiátricos asociados a la menopausia. Los estudios en ratas hembra adultas jóvenes ovariectomizadas no proporcionan soporte para trasladar los hallazgos de prolame a la población de mujeres maduras. Se desconoce si prolame produce efectos ansiolíticos en ratas hembra envejecidas, con deterioro natural del eje gonadal por la edad. Tampoco se sabe si este estrógeno induce efectos tróficos sobre el tejido uterino, en animales que tendrían, por envejecimiento, menor cantidad de receptores a estrógenos.

IV. HIPÓTESIS

El tratamiento crónico con prolame producirá un efecto tipo ansiolítico más pronunciado en los grupos de hembras adultas jóvenes respecto a las hembras envejecidas, así como en hembras ovariectomizadas respecto a las gonadalmente intactas. El efecto ansiolítico del prolame tendrá una eficacia equivalente a la del E_2 , pero producirá menos efectos uterotrópicos.

V. OBJETIVOS

General

Evaluar si el efecto ansiolítico del tratamiento crónico con prolame en ratas hembras es dependiente de la edad y/o la condición endocrina, así como comparar los efectos con el estrógeno de referencia E₂.

Particulares

1. Determinar si prolame produce un efecto tipo ansiolítico en las ratas hembras, similar al del estrógeno de referencia E₂.
2. Analizar si el efecto ansiolítico de prolame en ratas hembras se modifica por la edad (ratas adultas jóvenes y ratas de mediana edad), por la condición endocrina de las ratas (intactas versus ovariectomizadas), o por ambos factores.
3. Determinar si prolame produce efectos en la actividad motriz que pudieran interferir con su actividad ansiolítica.
4. Determinar si prolame produce efectos tróficos en el tejido uterino, y si éstos dependen de la edad, condición endocrina o ambos factores.
5. Analizar si los efectos de prolame sobre la ansiedad se asocian a altas concentraciones de estradiol y a la baja concentración de corticosterona.

VI. METODOLOGÍA

Diseño

Se realizó un estudio con un diseño experimental transversal de dos factores (tratamiento y edad/condición endocrina), con grupos independientes y una muestra aleatorizada (Figura 10).

Los animales se evaluaron en las siguientes condiciones endocrinas: a) ratas de ME gonadalmente intactas y con ciclos estrales irregulares, equivalente a la etapa de la perimenopausia en la mujer, por lo que cualquier cambio en el efecto de los tratamientos será atribuido a la edad y a la irregularidad endocrina, b) ratas de ME Ovx, condición establecida para identificar los cambios en el efecto de los tratamientos únicamente por edad y c) ratas adultas jóvenes Ovx, como un grupo control para observar el efecto de los tratamientos en animales no envejecidos, sin cambios hormonales.

Los tratamientos utilizados fueron el fármaco experimental prolame (60 y 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y, el estrógeno de referencia E_2 (40 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, equimolares a las de prolame), disueltos en aceite de maíz (vehículo), con el cual también se administró al grupo control. Las dosis más bajas se tomaron de un estudio previo (Lemini et al., 2013; Lemini et al., 2016) en el que se identificó un efecto de prolame sobre las conductas tipo depresión y ansiedad en la rata hembra. Tomando en consideración que los animales envejecidos responden a dosis más altas de algunos fármacos psicoactivos (Lopez-Rubalcava, Fernandez-Guasti, & Urba-Holmgren, 1996), todos los tratamientos se utilizaron en una dosis más alta respecto a la efectiva en hembras jóvenes (Lemini et al., 2013; Lemini et al., 2016).

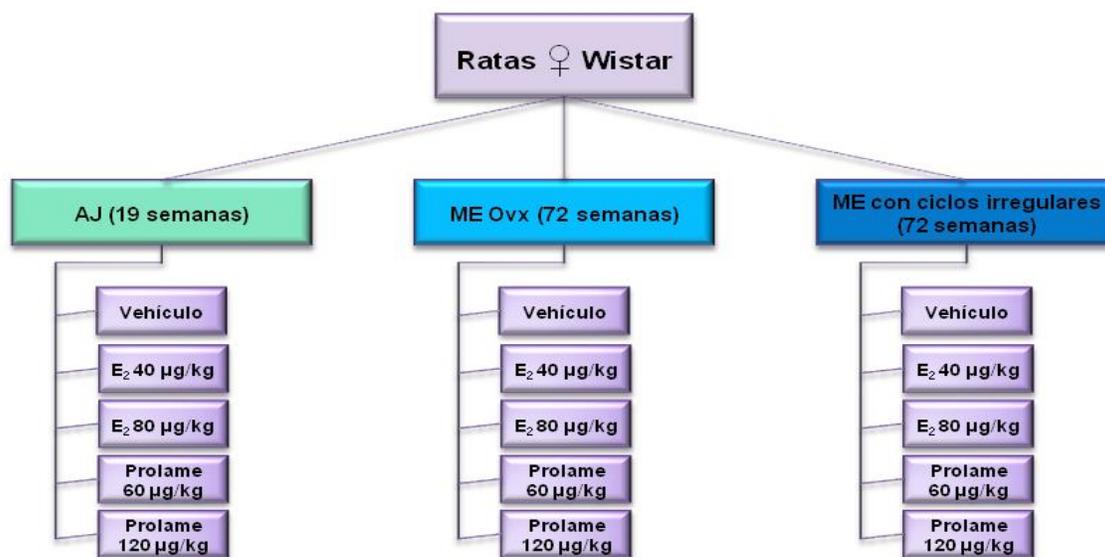


Figura 10. Diseño del estudio. Con tres brazos independientes (edad/condición endocrina), que incluyen 5 brazos de tratamiento cada uno. Edad de los animales al momento de las evaluaciones conductuales.

Sujetos

El estudio se realizó en ratas hembra AJ (3 meses de edad, al inicio del experimento) de la cepa Wistar, que se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), y en ratas hembra de ME (15 meses de edad al inicio del experimento) de la misma cepa, donadas por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Los animales se alojaron en condiciones estándar de bioterio, en grupos de 5 dentro de cajas de acrílico transparente de 43x34x19cm, en un cuarto con un ciclo de luz/obscuridad de 12/12 hrs (la luz se encendió a las 21:00 hrs), con libre acceso a alimento y agua (excepto durante las evaluaciones). El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana -062-Z00-1999). El presente protocolo fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética en Investigación del INPRFM (NC143370.1).

Fármacos

El prolame se sintetizó y proporcionó por el Laboratorio de Farmacología Endocrina del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM. El E₂ se adquirió en la compañía Sigma-Aldrich (San Luis, MO, USA). Todos los

estrógenos se disolvieron en aceite de maíz (La Gloria) y se conservaron a temperatura ambiente.

Variables

Independientes

- a) Tratamiento: Vehículo, prolame y E₂.
- b) Edad/Condición endocrina: Mediana edad (ME) con ciclos estrales irregulares, Mediana edad ovariectomizadas (ME Ovx) y adultas jóvenes ovariectomizadas (AJ Ovx).

Dependientes

- a) Efecto tipo ansiolítico en el LEC

Parámetros: Tiempo de permanencia en los brazos abiertos (TBA)
Tiempo de permanencia en los brazos cerrados (TBC)
Número de cruces (No. de cruces)

- b) Efecto tipo ansiolítico en la prueba de ED

Parámetros: Porcentaje de animales que muestran la conducta de enterramiento
Latencia de enterramiento (LE)
Tiempo de enterramiento (TE)

- c) Mediadores fisiológicos

Parámetros: Concentración de corticosterona en suero (pg/ml).
Concentración de E₂ en suero (pg/ml).

- d) Efectos secundarios

i. Prueba de actividad locomotora

Parámetros: Número de cuentas de movimientos ambulatorios
Número de cuentas de movimientos exploratorios (*rearings*)

- ii. Cambios en el tejido uterino

Parámetros: peso del útero en gramos (g)

Extrañas

- a) Condiciones de alojamiento (cuarto, temperatura, material de cama, luz, humedad y ruido).

- b) Salud general de los animales (presencia de ácaros, enfermedades y tumores).
- c) Manipulación (diferentes administradores y hora de administración).
- d) Evaluación (presencia del experimentador).

Pruebas conductuales

Laberinto elevado en cruz (LEC)

Para esta prueba se utilizó un dispositivo que consta de cuatro brazos de madera de 10 cm de ancho y 50 cm de largo cada uno, con una cubierta de acrílico blanco a manera de piso, colocados en forma de cruz sobre una plataforma de 50 cm de altura. Dos brazos se encuentran expuestos, mientras los otros dos tienen paredes de acrílico de 40 cm de altura. La evaluación se realizó en un cuarto iluminado por luz roja (60 watts), con niveles bajos de ruido, para evitar interferencias. Las ratas fueron colocadas individualmente en el laberinto, con la cara frente a alguno de los brazos abiertos; se permitió la exploración por 10 min. La cual fue videograbada para su análisis posterior.

El análisis de la conducta en el laberinto y las otras pruebas se realizó por observadores sin conocimiento de las condiciones de tratamiento y el estado endocrino de las ratas. Para evaluar el efecto tipo ansiolítico en el LEC, se registraron los siguientes parámetros:

1. Tiempo de permanencia en los brazos abiertos (TBA): tiempo acumulado (seg) que el animal permaneció, al menos con tres cuartas partes de su cuerpo y con las cuatro patas, en cualquiera de los brazos abiertos.

2. Tiempo de permanencia en los brazos cerrados (TBC): tiempo acumulado (seg) que el animal permaneció, al menos con tres cuartas partes de su cuerpo y con las cuatro patas, en cualquiera de los brazos cerrados.

3. Tiempo en el centro (TC): tiempo acumulado (seg) que el animal permaneció, al menos con tres cuartas partes de su cuerpo y con las cuatro patas, en el centro del laberinto.

4. Número total de cruces (No.de cruces): el número de cruces que la rata realizó en todos los brazos del laberinto. Se contó un cruce cada vez que el

animal salió o entró a cualquiera de los cuatro brazos, cruzando con las cuatro patas y la mayor parte de su cuerpo.

Un tratamiento con efectos ansiolíticos produce aumento del tiempo que los roedores permanecen en el brazo abierto del laberinto y, en correspondencia, reduce el tiempo de permanencia en el brazo cerrado. El número de cruces permite determinar si el tratamiento produce a la vez acciones estimulantes motoras (aumento del número de cruces) o acciones sedantes (menor número de cruces).

Enterramiento defensivo (ED)

Se colocó al animal dentro de la caja de prueba (16x22x33 cm), con una cama de aserrín de 3 cm de alto y un electrodo de 10 cm de largo incrustado en una de las paredes angostas de la caja. El electrodo se encuentra conectado a un estimulador de corriente constante que libera choques eléctricos de 0.3 mA (Fernandez-Guasti et al., 1999).

Previamente, los animales fueron alojados de manera individual en una caja de acrílico, con dimensiones idénticas a la caja de prueba, durante 20 minutos al día, por tres días. La prueba de ED inició colocando a cada animal en la caja de prueba, durante 10 minutos. Cada que el animal tocó el electrodo, recibió choques eléctricos, que desencadenaron conductas defensivas por parte del animal, las cuales fueron videograbadas para su análisis posterior. En esta prueba se analizaron los siguientes parámetros:

1. Latencia de enterramiento (LE): tiempo (seg) transcurrido desde que el animal recibió el primer choque eléctrico hasta el momento en que comenzó a expresar la conducta de enterramiento.

2. Tiempo de enterramiento (TE): tiempo acumulado (seg) que el animal invirtió en cubrir el electrodo con aserrín.

3. Tiempo de inmovilidad (TI): tiempo acumulado (seg) que el animal permaneció inmóvil (acostado, sentado, parado en al menos tres patas o en cualquier otra posición), presentando ligeros movimientos de la cabeza o la nariz que indican un estado de alerta.

4. Tiempo de freezing (TF): es el tiempo acumulado (seg) que el animal permaneció completamente inmóvil, justo después de recibir un choque eléctrico.

5. Número de choques (#CH): número de choques eléctricos recibidos por el animal, al contacto con el electrodo.

Los tratamientos ansiolíticos producen una reducción del TE sin modificar la LE. Para algunos fármacos, el efecto ansiolítico se observa con una disminución en el TF o en el TI. Por otra parte, se espera que los tratamientos no produzcan cambios en el número de choques eléctricos recibidos, que se interpretan como posibles acciones anti-nociceptivas.

Campo abierto (CA)

El sistema automático (PanLab) consta de un software (IR LE8811) acoplado a una caja de Plexiglás transparente (45x35x45 cm) con dos sensores infrarrojos colocados en cada una de las 4 paredes a una altura de 2.5cm y 10.5cm, respectivamente. La prueba consistió en colocar a cada hembra durante 5 minutos en la caja de plexiglás. Los datos de la actividad motriz se obtuvieron de manera automática en la computadora y se presentan como el número de cuentas de movimientos ambulatorios (cuentas/5 min).

La prueba de CA se realizó para descartar efectos sedantes, analgésicos o estimulantes, inducidos por los tratamientos, que pudieran interferir con su efecto ansiolítico. Una acción estimulante aumentaría el número de movimientos ambulatorios, mientras que una sedante lo disminuiría.

Medición del efecto trófico de los tratamientos sobre el peso uterino

Posterior a la obtención de sangre se extrajo el útero de cada animal, retirando todo material ajeno a este, como el tejido adiposo, y se pesó en una balanza analítica. El peso del útero se normalizó respecto al peso corporal de cada rata.

Evaluación del efecto de los tratamientos sobre mediadores fisiológicos

Concentración de corticosterona y de E₂ en suero

Los animales fueron sacrificados por decapitación 30 min después de las pruebas de conducta, este tiempo fue seleccionado debido a que coincide con la máxima concentración de corticosterona después de pruebas de conducta (Martínez-Mota, Ulloa, Herrera-Pérez, Chavira, Fernández-Guasti, 2011). Después de la decapitación se obtuvo la sangre troncal de los animales (ME, n=3 y AJ, n=5-9), la cual fue centrifugada (4000 rpm durante 25 min a 4° -C) para obtener el suero, el cual se almacenó a 20° -C. Las concentraciones de E₂ y corticosterona se determinaron con la técnica de radioinmunoensayo, utilizando kits comerciales y, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El procedimiento se realizó con tubos recubiertos con anticuerpos, donde el E₂ y la corticosterona marcados con I¹²⁵, compiten con los esteroides libres de la muestra, por los sitios de los anticuerpos. Después de una incubación, las formas unidas y no unidas de E₂ o corticosterona fueron separadas por decantación. Los tubos fueron analizados con un contador gamma, el conteo fue inversamente proporcional a la cantidad de hormonas presentes en el suero. La cantidad total de E₂ (pg/mL) y corticosterona (ng/mL) se determinó usando una curva de calibración. La actividad específica fue 4 µCi. La sensibilidad límite para el E₂ fue 8 pg/mL y para corticosterona de 5.7 ng/mL. Las variaciones intra- e inter- ensayo fueron de <7% y <8.1% para E₂, y de <12.2% y 14.9% para corticosterona.

Material e instrumentos

Frotis

Solución salina (NaCl al 0.9%), pipetas Pasteur de plástico, porta objetos, microscopio estándar compuesto (de dos lentes oculares y 4 objetivos).

Ovariectomía (Ovx)

Jeringa de 5 ml (para la anestesia) con aguja calibre 0.40mm x ½". Agente anestésico: 2 g de 2,2,2-Tribromoetanol, el cual se obtuvo de Sigma-Aldrich (San

Luis, MO, USA), disuelto en 8 ml de etanol, aforado a 100 ml con solución salina. Antisépticos: Yodo (Germisin, Farmacéuticos Altamirano, México) y desinfectante: Benzal (Antibenzil, Farmacéuticos Altamirano, México). Material para cirugía: tijeras de disección, pinzas de disección y de curación, gasas, algodón, hilo para sutura y aguja de sutura.

Decapitación y obtención de úteros

Guillotina estándar para roedores, embudos de vidrio, tubos de vacutainer (de vidrio y etiqueta roja –sin anticoagulante–), centrifuga Eppendorf con sistema de refrigeración, pipeta de 1ml (Pyrex), tubos de microcentrífuga (Eppendorf, 2ml), tijeras de disección, pinzas de disección y de extracción, y cajas de Petri de plástico.

Niveles hormonales de E₂ y corticosterona en suero

Kits comerciales de la línea Coat-A-Count, marca Siemens (Alemania) para detectar E₂ (TKE21) y corticosterona (TKRC1).

Procedimiento general

Los animales de ME utilizados en este trabajo fueron donados por el CINVESTAV al cumplir seis meses de edad, por lo que se les mantuvo en el bioterio del INPRFM con los cuidados necesarios hasta que cumplieron 15 meses de edad (cuando comenzó el estudio). Posteriormente se tomaron frotis vaginales diariamente durante un mes, para corroborar que las ratas estuvieran cursando la etapa de ciclos irregulares, de acuerdo con lo indicado en Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti (2011); las hembras en fase de estro constante o diestro persistente se excluyeron del estudio. Las ratas de ME fueron asignadas a dos grupos, al primero se le realizó una Ovx para eliminar la principal fuente de estrógenos, y se les mantuvo durante tres semanas más (periodo de recuperación) en las mismas condiciones, mientras que al segundo grupo, se le continuó tomando frotis por dos semanas.

En el caso de los animales jóvenes, una vez recibidos se les alojó en el bioterio del INPRFM hasta que cumplieron 12 semanas de edad. Posteriormente se les realizó una Ovx y se mantuvieron en las mismas condiciones que las hembras

de ME. Durante el tiempo de recuperación de los animales se prepararon las soluciones y se conservaron en frascos ámbar a temperatura ambiente hasta el término del experimento.

Tres semanas después de la cirugía los animales fueron asignados de forma aleatoria a uno de los 15 grupos experimentales, de acuerdo a su condición endocrina (ver diseño, Figura 10). Los tratamientos se administraron por vía subcutánea, aproximadamente a las 10:00 am, en una dosis de 40 µg/kg de E₂ o 60 µg/kg de prolame (en 0.1 mL de vehículo) o bien de 80 µg/kg de E₂ o 120 µg/kg de prolame (0.2 ml). Las ratas Ovx fueron tratadas durante 26 días, mientras que las ratas gonadalmente intactas recibieron el tratamiento durante 26-31 días, con el fin de que la decapitación de los animales se realizara en la fase de diestro; la fase del ciclo estral se determinó por medio del análisis citológico de los frotis vaginales. Se eligió esta fase porque semeja una condición endocrina de niveles hormonales muy bajos. El esquema de administración de los tratamientos se seleccionó con base en estudios previos (Lemini et al., 2013; Limon et al., 2012).

El día 24 del tratamiento (Figura 11), y media hora después de la última administración (10:30 am), los animales fueron evaluados en el LEC, y dos horas después (12:30 pm), en la prueba de ED. El último día de tratamiento, aproximadamente 1 hora antes de la decapitación, los animales se evaluaron en la prueba de CA (aproximadamente a las 10:30 am) para evaluar si el tratamiento produce cambios en la actividad motriz.

Todas las evaluaciones conductuales se realizaron en un cuarto iluminado con luz roja de 60 W, eliminando la mayor fuente de sonidos posible, y fueron videograbadas. Posterior a la prueba de CA, los animales fueron decapitados para obtener su sangre troncal. Además se les retiró el útero para pesarlo con el fin de tener una medición del efecto trófico de los tratamientos. Los niveles séricos de corticosterona y E₂ se determinaron en el Laboratorio de Neurofisiología Molecular, del INPRFM, con el apoyo técnico del Biol. Gilberto Matamoros.

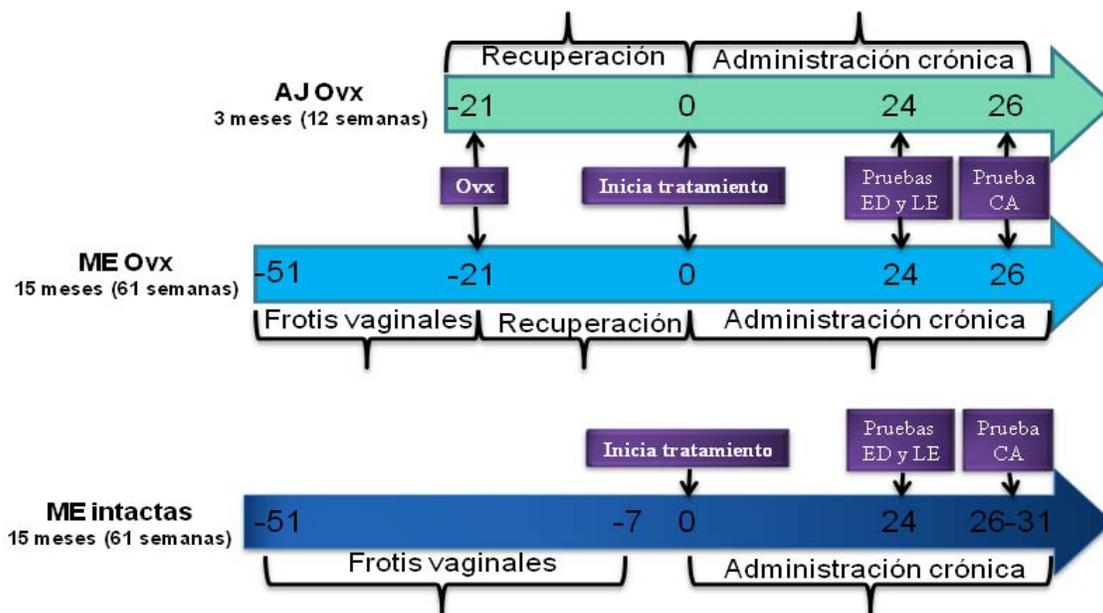


Figura 11. Esquema temporal del experimento. Con tres flechas temporales, las cuales representan las tres condiciones endocrinológicas del diseño (AJ Ovx, ME Ovx y ME intactas). ED, Enterramiento Defensivo; LE, Laberinto Elevado; CA, Campo Abierto, AJ, Adultos Jóvenes; ME, Mediana Edad, Ovx, Ovariectomía.

Análisis estadístico

Los resultados de las diferentes evaluaciones, se analizaron con un ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Tukey, en los casos donde no se encontraron diferencias con este análisis, se realizó un análisis con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, La cual se utilizó también para observar los efectos de los tratamientos en un grupo de ratas con las mismas condiciones endocrinas. Se utilizó U de Mann Whitney para comparar grupos específicos. Las proporciones de ratas que enterraron en la prueba de ED fueron comparadas con una prueba F de Fisher. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Sigma Plot versión 12.

VII. RESULTADOS

1. EFECTO ANSIOLÍTICO DE E₂ Y PROLAME

Prueba de laberinto elevado en cruz

Tiempo de permanencia en brazos abiertos (TBA): En el panel A de la Figura 12, se observa el efecto de los tratamientos y de la edad/condición endócrina sobre el TBA. El ANOVA de dos vías no mostró diferencias por los factores de edad/condición endócrina ($F=2.524$, gl 2,141, $p=0.084$), tratamiento ($F=2.241$, gl 4,141, $p=0.068$) ni por la interacción de éstos ($F=1.443$, gl 8,141, $p=0.184$). La comparación de los grupos control de cada edad/condición endócrina con una prueba de Kruskal Wallis tampoco mostró diferencia significativas en los niveles de ansiedad en el LEC ($H=0.245$, gl 2, $p=0.885$).

En los resultados del ANOVA de dos vías, no se encontraron resultados significativos, lo cual pudo deberse a la variabilidad de los datos, lo que sugirió realizar un análisis con una prueba no paramétrica. Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis indican que los tratamientos produjeron efectos estadísticamente significativos en las ratas AJ-Ovx ($H=19.667$, gl 4, $p<0.001$), ya que las dos dosis de prolame que se evaluaron (60 y 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) aumentaron el TBA con respecto al vehículo ($p<0.05$); la dosis de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ también aumentó respecto a E₂ a 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.05$). De acuerdo con las comparaciones pareadas U de Mann-Whitney, el E₂ a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ incrementó el TBA respecto al vehículo ($p=0.011$).

Ninguno de los tratamientos modificó de forma estadísticamente significativa el TBA en las ratas de ME-Ovx ($H=1.330$, gl 4, $p=0.856$) ni en las de ME-Int ($H=0.396$, gl 4, $p=0.885$).

Tiempo de permanencia en brazos cerrados (TBC): En el panel B de la figura 12 se ilustra el efecto de los tratamientos y la edad/condición endócrina sobre el TBC. El ANOVA de dos vías mostró una diferencia por edad/condición endócrina ($F=33.332$, gl 2,141, $p<0.001$) y por la interacción de factores ($F=0.215$, gl 8,141, $p=0.044$), pero no por el tratamiento ($F=0.215$, gl 4,141, $p=0.930$); es decir, el efecto

de los tratamientos estuvo influido por la edad y la condición endócrina. En los animales AJ-Ovx, el tratamiento con prolame a 120 µg/kg disminuyó el TBC respecto al vehículo ($p < 0.001$) y al E₂ 80 µg/kg ($p = 0.001$). El tratamiento con E₂ a 40 µg/kg produjo menor TBC en las ratas AJ-Ovx que en el grupo de ME-Int ($p = 0.028$), mientras que prolame a 60 µg/kg fue más efectivo para reducir el TBC en AJ-Ovx respecto a las de ME-Ovx ($p = 0.012$) y ME-Int ($p = 0.005$). Prolame a 120 µg/kg también redujo de manera significativa el TBC en AJ-Ovx con respecto a los otros grupos de edad ($p < 0.001$).

No se encontraron diferencias significativas al comparar únicamente los grupos administrados con vehículo ($H = 1.083$, $gl = 2$, $p = 0.582$). Adicionalmente, se corroboró con una prueba U de Mann-Whitney ($P = 0.006$), que el E₂ a 40 mg/kg disminuye el TBC con respecto al vehículo en las ratas AJ-Ovx.

Tiempo de permanencia en el centro (TC): El ANOVA de dos vías para el TC (panel C), mostró un efecto principal por edad/condición endocrina ($F = 33.332$, $gl = 2, 141$, $p < 0.001$) y por su interacción con el tratamiento ($F = 2.034$, $gl = 8, 141$, $p = 0.047$) pero no por este último factor ($F = 0.215$, $gl = 4, 141$, $p = 0.930$). La prueba *post-hoc* indicó que el prolame a 120 µg/kg, aumentó el TC en las ratas AJ-Ovx respecto a su grupo control ($p = 0.009$). Las hembras AJ-Ovx tratadas con E₂ a 40 µg/kg, permanecieron más tiempo en el centro que las de ME ($p < 0.001$), mientras que las tratadas con E₂ a dosis de 80 µg/kg mostraron mayor TC, únicamente en comparación con las de ME-Ovx ($p = 0.041$). Por otro lado, las ratas AJ-Ovx con prolame a 60 µg/kg, mostraron más TC que las ratas de ME-Ovx ($p = 0.017$) y ME-Int ($p = 0.008$), al igual que las AJ-Ovx con prolame a 120 µg/kg con respecto a las de ME ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar únicamente los grupos administrados con vehículo, de cada edad/condición endócrina ($H = 3.142$, $gl = 2$, $p = 0.208$).

Numero de cruces (#C): El ANOVA de dos vías mostró un efecto principal por la edad/condición endócrina ($F = 14.385$, $gl = 2, 141$, $p < 0.001$) sobre el #C que no se observó por los tratamientos ($F = 0.659$, $gl = 4, 141$, $p = 0.621$) ni por la interacción de

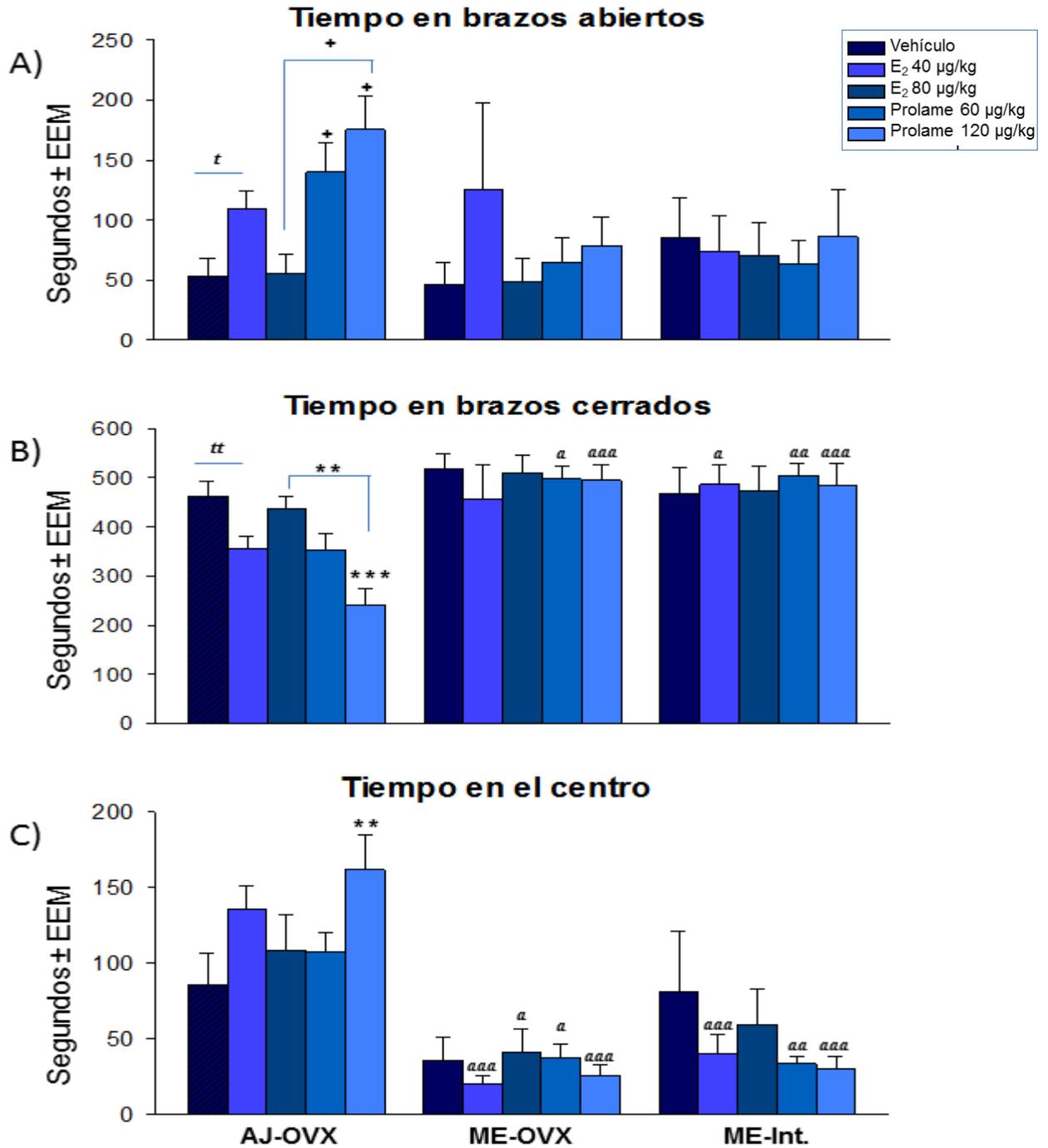


Figura 12. Resultados del tratamiento con E₂ y con prolame en la prueba de LEC. TBA, TBC y TC en segundos. Los datos se expresan como la media + E.E.M. Resultados de la prueba de Tukey: **p<0.01, ***p<0.001 vs vehículo de la misma edad/condición endocrina, a p<0.05, aa p<0.01, aaa p<0.001 vs AJ-Ovx con el mismo tratamiento. Prueba de Mann-Whitney: t p<0.005, tt p<0.001. Prueba de Kruskal-Wallis: + <0.05 vs vehículo o grupo indicado, de la misma edad/condición endocrina.

ambos factores ($F=0.716$, $gl\ 8,141$, $p=0.677$). La diferencia se debe a que el grupo de AJ-Ovx ($p<0.001$) cruzó más veces el centro del laberinto que los otros dos grupos; sin embargo; no se observó un efecto significativo al comparar únicamente los tres grupos administrados con el vehículo ($H= 5.339$, $gl= 2$, $p=0.069$). Por último, el análisis en cada grupo de edad no indicó diferencias significativas en ninguno de los grupos (AJ-Ovx, $H=4.489$, $gl\ 4$, $p=0.344$; ME-Ovx, $H=3.285$, $gl\ 4$, $p=0.511$; ME-Int, $H=1.665$, $gl\ 4$, $p=0.797$).

Prueba de enterramiento defensivo

Puesto que algunas ratas no expresaron la conducta de enterramiento al recibir los choques eléctricos, se excluyeron del análisis estadístico únicamente en esta prueba. En la Tabla 1 se muestra el porcentaje y número de animales que enterró en cada grupo. Se realizó un análisis de proporciones con la prueba F de Fisher (Tabla de 2x2) entre los animales que sí expresaron la conducta de enterramiento en cada grupo. Los resultados de este análisis mostraron que la inhibición de la conducta de enterramiento no se atribuye a los tratamientos, ya que la prueba no mostró resultados estadísticamente significativos ($p<0.05$).

Tabla 1. Animales que expresaron la conducta de enterramiento				
Edad/condición endocrina	Tratamiento	N total	% de animales que enterraron	N de animales que enterraron
AJ-Ovx	Vehículo	14	57.1429	12
	E2 40 µg/kg	14	100	14
	E2 80 µg/kg	10	80	8
	Prolame 60 µg/kg	15	80	12
	Prolame 120 µg/kg	14	61.53	8
ME-Ovx	Vehículo	9	88.88	8
	E2 40 µg/kg	8	50	4
	E2 80 µg/kg	9	77.77	7
	Prolame 60 µg/kg	9	66.66	6
	Prolame 120 µg/kg	9	77.77	7
ME-Int	Vehículo	9	88.88	8
	E2 40 µg/kg	9	88.88	8
	E2 80 µg/kg	8	77.77	6
	Prolame 60 µg/kg	10	80	8
	Prolame 120 µg/kg	9	100	9

AJ-Ovx, adultas jóvenes ovariectomizadas; ME-Ovx, mediana edad ovariectomizadas; ME-Int, mediana edad intactas; N, número de animales por grupo.

Latencia de enterramiento (LE): El ANOVA de dos vías no mostró resultados significativos por la edad/condición endócrina ($F=0.685$, gl 2,107, $p=0.506$), los tratamientos ($F=0.036$, gl 4,107, $p=0.997$) o la interacción de ambos factores ($F=1.149$, gl 8,107, $p=0.337$). La prueba de Kruskal-Wallis tampoco mostró diferencias significativas en cada grupo de edad (AJ-Ovx, $H=0.420$, gl 4, $p=0.981$; ME-Ovx, $H=4.554$, gl 4, $p=0.336$; ME-Int, $H=2.361$, gl 4, $p=0.670$), ni en la comparación de los grupos tratados con vehículo ($H=1.125$, gl 2, $p=0.570$).

Tiempo de enterramiento (TE): El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo por el tratamiento ($F=3.726$, gl 4,107, $p=0.007$), pero no por la edad/condición endócrina ($F=0.833$, gl 2,107, $p=0.437$) o por la interacción de factores ($F=1.206$, gl 8,107, $p=0.303$). Las diferencias se observaron entre los grupos tratados con E_2 a 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que produjo los menores niveles de TE, respecto a prolame con 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.003$), sin embargo, estas dosis no son equimolares, por lo que esta comparación no revela efectos importantes.

Al realizar un análisis entre los grupos tratados con vehículo no se encontraron diferencias ($H=1.460$, gl 2, $p=0.482$). Por su parte, el ANOVA de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas en las ratas AJ-Ovx ($H=14.271$, gl 4, $p=0.006$), que se atribuyen únicamente a los efectos de E_2 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y de prolame a 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*vide supra*). Sin embargo, el mismo análisis no mostró diferencias por tratamientos en los grupos ME-Ovx ($H=4.331$, gl 4, $p=0.363$) y ME-Int ($H=3.284$, gl 4, $p=0.512$).

Tiempo de inmovilidad (TI): No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el TI por edad/condición endocrinológicas ($F=0.733$, gl 2,107, $p=0.483$) ni por el tratamiento ($F=1.774$, gl 4,107, $p=0.139$), pero sí por la interacción de estos factores ($F=2.237$, gl 8,107, $p=0.030$). La prueba *post-hoc* mostró que las diferencias se concentraron en el grupo de las hembras AJ-Ovx, ya que el tratamiento con E_2 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aumentó el TI con respecto a los grupos tratados con E_2 a dosis de 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, prolame a 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y al vehículo. También se encontró que las ratas AJ-Ovx tratadas con E_2 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mostraron más TI que las de ME-Int con el mismo tratamiento (Figura 13, panel A). Sin embargo no se encontró ninguna

diferencia estadística entre los grupos tratados con vehículo ($H=0.06$, gl 2, $p=0.970$), ni entre los tratamientos en los grupos de ME-Ovx ($H=6.873$, gl 4, $p=0.143$) o ME-Int ($H=1.946$, gl 4, $p=0.746$).

Tiempo de freezing (TF): El ANOVA indicó un efecto significativo por el tratamiento ($F=2.705$, gl 4,107, $p=0.034$) y por la interacción de los factores ($F=3.207$, gl 8,107, $p=0.003$), pero no por la edad/condición endocrina ($F=1.142$, gl 2,107, $p=0.323$), sobre el TF. En los animales de ME-Int la prueba *post-hoc* reveló que el tratamiento con E₂ a 80 µg/kg disminuyó el TF respecto a E₂ a 40 µg/kg ($p=0.002$) y a prolame 60 µg/kg ($p=0.004$), pero no respecto al vehículo. Las ratas de ME-Int tratadas con E₂ a 40 µg/kg mostraron más TF que el grupo de ME-Ovx ($p=0.004$) con el mismo tratamiento; asimismo, las ratas de ME-Int mostraron más TF que el grupo de AJ-Ovx, ambos grupos tratados con prolame 60 µg/kg ($p=0.024$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos administrados con vehículo, al analizarlos de manera independiente ($H=0.552$, gl 2, $p=0.759$), los resultados se muestran en el panel B de la figura 13.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas del TF en el grupo de ratas AJ-Ovx ($H=10.951$, gl 4, $p=0.027$); la diferencia se observó entre los grupos tratados con E₂ a 40 µg/kg y prolame a 120 µg/kg, que no son equimolares. En las de ME-Int ($H=13.368$, gl 4, $p=0.010$), el tratamiento con E₂ a 40 µg/kg y prolame a 120 µg/kg aumentó el TF respecto a los resultados con E₂ a 80 µg/kg. En las ratas de ME-Ovx no se observaron diferencias significativas ($H=8.545$, gl 4, $p=0.074$).

Número de choques (#ch): El ANOVA de dos vías no mostró diferencias sobre el #ch por edad/condición endocrina ($F=2.129$, gl 2,107, $p=0.124$), tratamientos ($F=0.270$, gl 4,107, $p=0.270$) o interacción de los factores ($F=0.826$, gl 8,107, $p=0.581$), lo cual se afirmó al comparar cada grupo de edad/condición endocrina con una prueba de Kruskal-Wallis (AJ-Ovx, $H=3.025$, gl 4, $p=0.554$; ME-Ovx, $H=0.346$, gl 4, $p=0.987$; ME-Int, $H=5.843$, gl 4, $p=0.211$). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar únicamente los grupos tratados con el vehículo ($H=1.128$, gl 2, $p=0.569$).

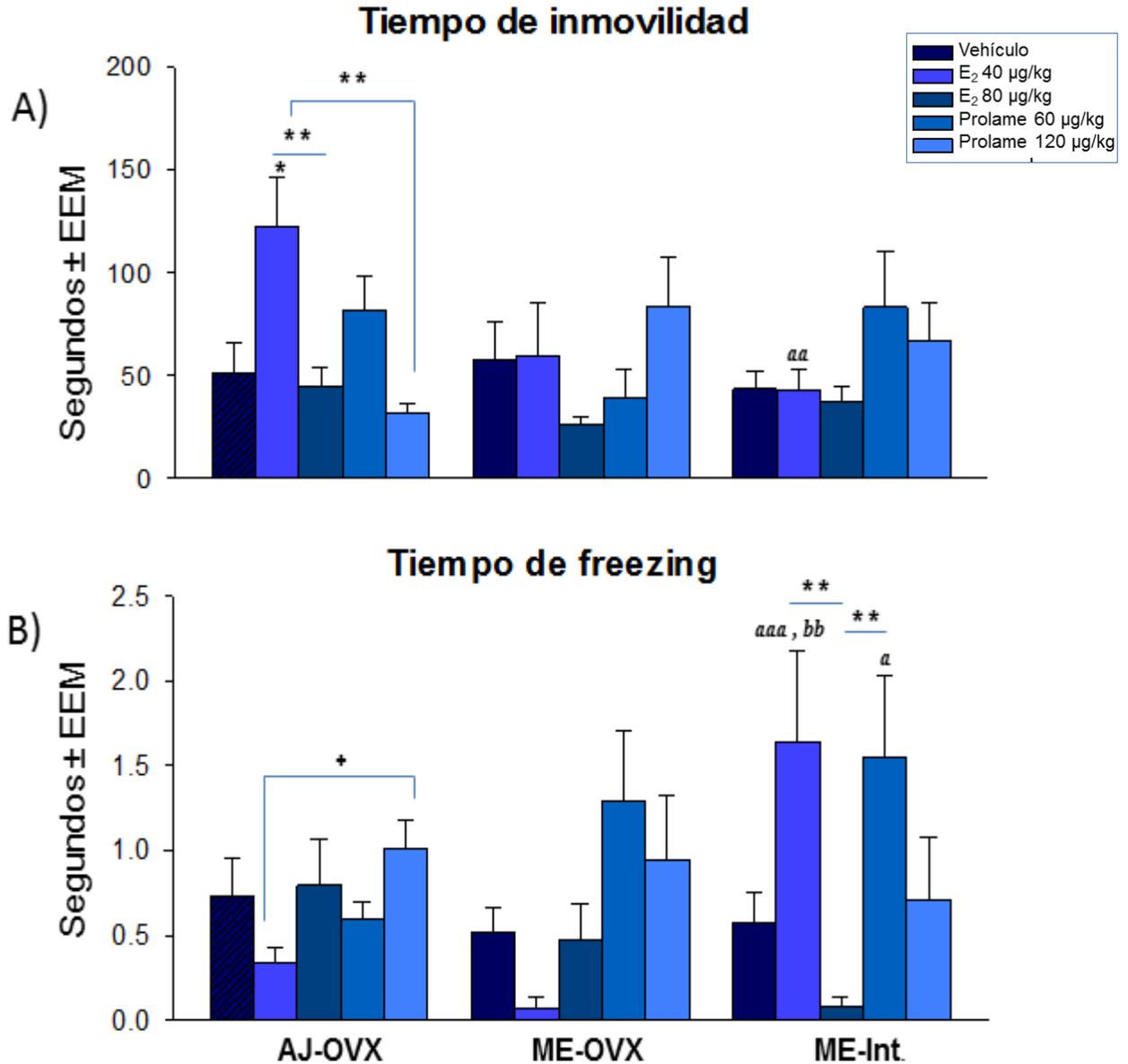


Figura 13. Resultados del tratamiento con E₂ y con prolame en la prueba de ED. TI y TF en segundos. Los datos se expresan como la media + E.E.M.. Prueba de Tukey: * p<0.05 ** p<0.01 vs vehículo o el grupo indicado de la misma edad/condición endocrina, a p<0.05, aa p<0.01, aaa p<0.001 vs AJ-Ovx con el mismo tratamiento; bb p<0.01 vs ME-Ovx con el mismo tratamiento. Prueba de Dunn: + p<0.05.

2. EFECTO DE PROLAME Y E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD MOTRIZ

Movimientos ambulatorios (MA) en la prueba de Campo Abierto: Los resultados del ANOVA de dos vías indicó una diferencia estadísticamente significativa en los MA por edad/condición endocrina (F=29.161, gl 2,141, p<0.001), por tratamiento

($F=4.196$, $gl\ 4,141$, $p=0.003$) y por la interacción de ambos factores ($F=4.309$, $gl\ 4.309$, $p<0.001$). La prueba *post-hoc* mostró una diferencia en el grupo de ratas AJ-Ovx tratadas con prolame a $60\ \mu\text{g}/\text{kg}$ respecto a E_2 a $80\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.004$) y a E_2 a $40\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.002$), ya que el primero disminuyó los movimientos ambulatorios. E_2 a $80\ \mu\text{g}/\text{kg}$ aumentó la actividad ambulatoria en el grupo de ME-Int con respecto a los animales tratados con E_2 a $40\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.001$), prolame a $60\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.005$), prolame a $120\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.014$) y con el vehículo ($p=0.002$), el análisis no mostró diferencias significativas dentro del grupo de animales de ME-Ovx. Por otro lado, el grupo de ME-Ovx administrado con E_2 a $80\ \mu\text{g}/\text{kg}$ mostró menos MA que el grupo de AJ-Ovx ($p=0.048$) con el mismo tratamiento. Al comparar las ratas de ME-Int con las AJ-Ovx y las de ME-Ovx, el análisis mostró que los animales de ME-Int administrados con Vh ($p<0.001$), $E_2\ 40\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.001$) o $E_2\ 80\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.033$), tuvieron menos MA que los grupos de AJ-Ovx administrados con el mismo tratamiento. Mientras que las hembras de ME-Int, administradas con las dosis bajas de los tratamientos; prolame a $60\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0.001$) o $E_2\ 40\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ($p=0.033$) mostraron menos MA que las de ME-Ovx (Figura 14).

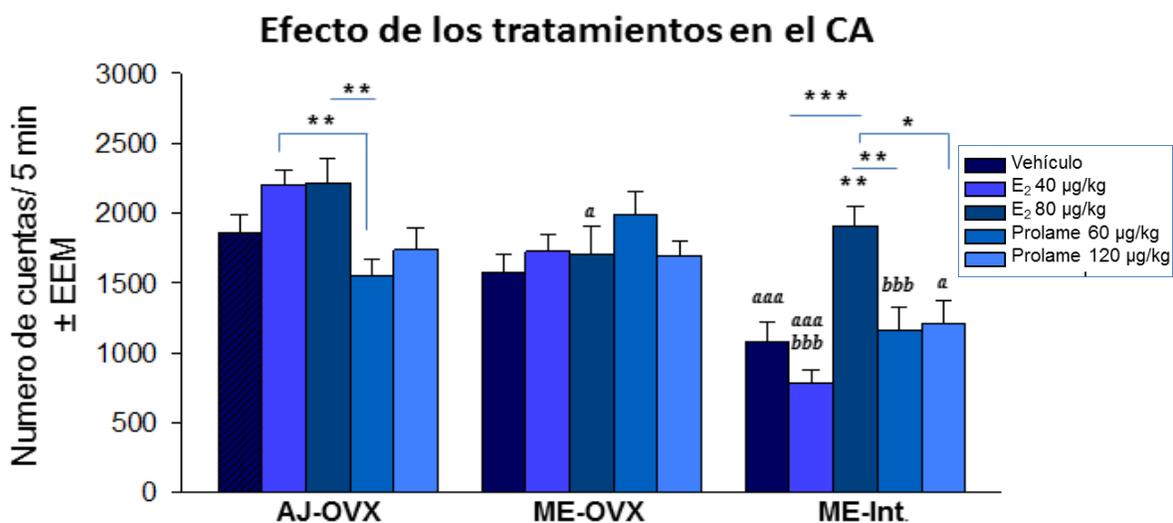


Figura 14. Resultados del tratamiento con E_2 y con prolame en la prueba de CA. Numero de movimientos ambulatorios en 5 min. Los datos se expresan como la media + S.E.M. Descripción de la figura. Prueba de Tukey: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs vehículo o grupo señalado de la misma edad/condición endocrina, *a* $p<0.05$, *aaa* $p<0.001$ vs AJ-Ovx con el mismo tratamiento, *bbb* $p<0.001$ vs ME-Ovx con el mismo tratamiento.

Al analizar únicamente los grupos administrados con vehículo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($H=10.932$, gl 2, $p=0.004$), ya que en general los animales AJ-Ovx tienen más MA que las ratas de ME-Int.

3. EFECTO TRÓFICO DE PROLAME Y E₂ SOBRE EL TEJIDO UTERINO

Peso uterino: En la **Figura 15**, se ilustra el efecto de los tratamientos sobre el peso uterino. El ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas por edad/condición endocrina ($F= 7.588$, gl 2,104, $p<0.001$) y por tratamiento ($F=27.751$, gl 4,104, $p<0.001$), pero no por la interacción de factores ($F=1.256$, gl 8,104, $p=0.275$).

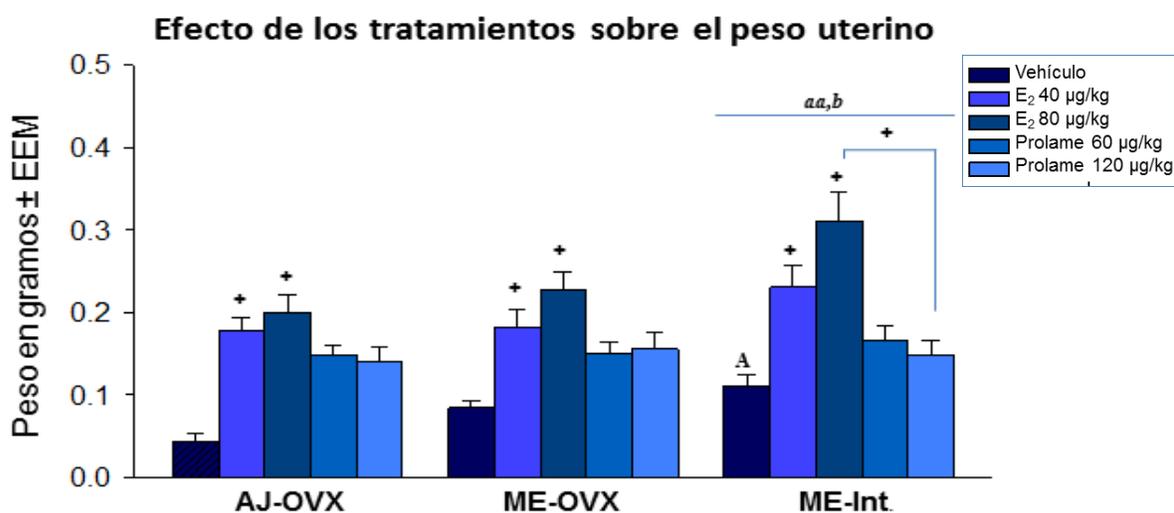


Figura 15. Resultados del tratamiento con E₂ y con prolame sobre el peso uterino. Peso del útero en gramos, normalizado (peso absoluto del útero/1000*peso del animal en gramos). Los datos se expresan como la media + E.E.M. Efecto de los tratamientos sobre el peso uterino. Resultados de la prueba de Tukey: aa $p<0.01$ vs AJ-Ovx con el mismo tratamiento, b $p<0.05$ vs ME-Ovx con el mismo tratamiento. Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn's: + $p<0.05$ vs vehículo de la misma edad/condición endocrina, A $p<0.05$ vs AJ-Ovx con el mismo tratamiento.

La prueba *post-hoc* indicó que, las ratas de ME Int tuvieron un peso uterino mayor que las ratas AJ-Ovx ($p= 0.001$) y las de ME-Ovx ($p=0.023$). Este resultado se confirmó con el ANOVA de una vía entre los grupos control de cada edad ($H= 10.487$, gl= 2, $p=0.005$). Las diferencias por el factor tratamiento observadas en el ANOVA, se debieron principalmente a que el tratamiento con E₂ 80 µg/kg, aumentó de manera significativa el peso uterino respecto al vehículo, y a ambas dosis de prolame ($p<0.001$), así como respecto a la dosis baja de E₂ (40 µg/kg; $p=0.023$). Prolame (60 y 120µg/kg) aumentó el peso uterino con respecto al grupo

administrado con vehículo ($p < 0.001$), mientras que E_2 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, lo aumentó con respecto al vehículo y a prolame a dosis de 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p = 0.037$).

4. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE MEDIADORES FISIOLÓGICOS

Concentración sérica de corticosterona (ng/ml): El ANOVA de dos vías indicó diferencias por el factor de edad/condición endocrina ($F = 15.534$, gl 2,58, $p < 0.001$), pero no por el tratamiento ($F = 2.159$, gl 4,58, $p = 0.085$) o por la interacción de los factores ($F = 2.02$, gl 8,58, $p = 0.06$). Lo anterior se debe a que las ratas AJ-Ovx muestran niveles más bajos de corticosterona (Tabla 2) respecto a las de ME-Ovx ($p = 0.015$) y ME-Int (< 0.001). Sin embargo, al comparar únicamente los grupos administrados con vehículo no se observó esta diferencia ($H = 4.459$, gl = 2, $p = 0.108$). No se encontraron efectos significativos en cada grupo de edad/condición endocrina (AJ-Ovx, $H = 8.120$, gl = 4, $p = 0.087$; ME-Ovx, $H = 4.928$, gl = 4, $p = 0.295$; ME-Int, $H = 5.605$, gl = 4, $p = 0.231$).

Tabla 2. Efecto del E_2 y del prolame sobre las concentración sérica de corticosterona y E_2					
Edad/condición endocrina	Tratamiento	Corticosterona sérica		E_2 sérico	
		(ng/mL)	N	(pg/mL)	N
AJ-Ovx	Vehículo	876.842 ± 89.968	10	95.47 ± 38.120	10
	E_2 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	671.667 ± 105.073	7	2315.09 ± 612.854	4
	E_2 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$	759.816 ± 97.018	7	1768.80 ± 493.056	6
	Prolame 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$	514.927 ± 72.00	7	45.24 ± 14.787	9
	Prolame 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$	558.054 ± 100.572	8	38.43 ± 22.573	8
ME-Ovx	Vehículo	984.613 ± 61.500	3	32.50 ± 4.486	3
	E_2 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1076.863 ± 85.255	3	1588.74 ± /	1
	E_2 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1006.480 ± 306.649	3	-	0
	Prolame 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$	808.205 ± 59.526	4	281.77 ± 182.425	3
	Prolame 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$	957.782 ± 47.954	4	297.64 ± 14.020	2
ME-Int	Vehículo	1725.907 ± 390.535	3	44.40 ± 4.669	3
	E_2 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$	943.927 ± 213.374	3	2222.92 ± 975.750	3
	E_2 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$	696.903 ± 243.741	3	2571.50 ± 2058.42	2
	Prolame 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1302.645 ± 294.018	4	180.82 ± 61.338	3
	Prolame 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1447.583 ± 316.653	4	169.41 ± 13.929	3

Tx, tratamiento; media ± E.E.M.; - Valores por encima del límite de concentración del kit.

Concentración sérica de E_2 (pg/ml): Los niveles de E_2 se elevaron como consecuencia de la administración de los estrógenos. Se identificaron algunos

valores superiores al límite detectado por el kit (3600 pg/mL), los cuales no se incluyeron en el análisis estadístico (Tabla 2). El ANOVA de dos vías indicó una diferencia significativa por el tratamiento ($F=10.196$, gl 4,49, $p<0.001$), ya que E_2 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aumentó la concentración de E_2 con respecto a los grupos tratados con prolame o con el vehículo. No se encontraron diferencias por la edad/condición endocrina ($F=0.138$, gl 4,49, $p=0.872$), mientras que el análisis por interacción no se realizó, debido a que al sacar los valores superiores a 3600 pg/mL, el número de datos por grupo fue insuficiente.

Al analizar la concentración de E_2 en los animales tratados con vehículo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($H=2.133$, gl 2, $p=0.382$). En las ratas AJ-Ovx los tratamientos mostraron diferencias significativas ($H=22.304$, gl=4, $p<0.001$), ya que E_2 administrado a 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aumentó la concentración sérica de E_2 con respecto a ambas dosis de prolame. En las ratas de ME-Ovx también se encontró un efecto significativo por los tratamientos ($H=6.511$, gl=3, $p=0.029$), aunque la prueba *post-hoc* no indicó diferencias entre grupos concretos. No se incluyó el grupo de E_2 a 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ya que todos los valores se encontraron por encima del límite de detección del kit (Tabla 2). En las ratas de ME-Int también se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($H=11.324$, gl=4, $p=0.023$), ya que el grupo que recibió E_2 a dosis de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tuvo mayor concentración sérica de E_2 en comparación con el grupo administrado con vehículo.

VIII. DISCUSIÓN

En esta investigación se analizó si el efecto ansiolítico de prolame en ratas hembra Wistar se modifica en función de la edad, de la condición endocrina o bien de la interacción de ambos factores. Para la evaluación se utilizaron los modelos de laberinto elevado en cruz y de enterramiento defensivo, ambos sensibles a fármacos ansiolíticos. A su vez, para investigar los posibles efectos secundarios o adversos del tratamiento analizamos los cambios en la actividad motora y en el peso del útero, además de las concentraciones de corticosterona y E₂ para identificar una posible vía de acción. Los resultados de este trabajo se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la evaluación del Tx crónico con E ₂ y prolame										
Edad/ Condición endocrina	Tx (µg/kg)	LEC			ED		CA	Peso útero	Concentración en suero	
		TBA	TBC	TC	TI	TF	MA		C	E ₂
AJ-Ovx	E ₂ 40	(t)↑	(t)↓↓	=	↑	=	=	+	=	↑↑↑
	E ₂ 80	=	=	=	=	=	=	+	=	↑↑↑
	Prolame 60	+	=	=	=	=	=	=	=	↓
	Prolame 120	+	↓↓↓	↑↑	=	=	=	=	=	↓
ME-Ovx	E ₂ 40	=	=	=	=	=	=	+	=	↑↑↑
	E ₂ 80	=	=	=	=	=	=	+	=	↑↑↑
	Prolame 60	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
	Prolame 120	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
ME-Int.	E ₂ 40	=	=	=	=	↑↑	=	+	=	↑↑↑
	E ₂ 80	=	=	=	=	=	↑↑	+	↑	↑↑↑
	Prolame 60	=	=	=	=	=	=	=	=	↑
	Prolame 120	=	=	=	=	=	=	=	=	↑

Resultados respecto al grupo administrado con vehículo, de acuerdo a cada edad/condición endocrina. Resultados con la prueba t de student: (t)↑, aumentó p<0.05; (t)↓↓, disminuyó p<0.01, resultados con la prueba de Tukey: =, no modificó; ↑, aumentó p<0.05; ↑↑, aumentó p<0.01; ↑↑↑, aumentó p<0.001; ↓↓↓, disminuyó p<0.001, resultados con la prueba de Dunn's: +, aumentó p<0.05.

1. EFECTO ANSIOLÍTICO DEL E₂ Y PROLAME EN RATAS HEMBRA

El envejecimiento favorece la expresión de ansiedad en ratas hembra

Estudios clínicos han asociado la madurez con mayor prevalencia de TA, particularmente en mujeres en la transición a la menopausia. Asimismo, algunos autores como Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti (2011); Walf & Frye (2010) han reportado que la respuesta de ansiedad en roedores de laboratorio depende de la edad, del sexo y de la condición endocrina. En el presente trabajo no se encontró una asociación entre la edad de las ratas hembra y la expresión de ansiedad en las pruebas de ED y de LEC, considerando como principales indicadores el TE y el TBA respectivamente. Dichos parámetros tampoco se modificaron por efecto de la Ovx. Sin embargo, en la población de ME administradas con vehículo, principalmente en las intactas, se registraron respuestas de ansiedad reflejadas en conductas pasivas, las cuales no se emitieron por las AJ. Estas conductas fueron permanecer más en los brazos cerrados (TBC) en el LEC y un aumento en la expresión de *freezing* en el ED, las cuales podrían reflejar una respuesta de tipo pánico, por lo que la ansiedad asociada al envejecimiento probablemente se refleja sólo a través de conductas pasivas en las ratas hembra.

En el presente trabajo se descarta la influencia de factores sociales, por lo que las únicas variables a las que se les atribuyen los cambios en los parámetros de expresión de ansiedad (TF y TBC) son la edad y la condición endocrina de las ratas. La discordancia entre los resultados de este trabajo y las condiciones observadas en mujeres se puede atribuir a que en estas confluyen no sólo factores biológicos, sino también sociales y epigenéticos. Entre los primeros destacan eventos como el divorcio, la salida de los hijos del hogar o bien procesos de duelo, por otra parte, la adversidad en la infancia o la resiliencia al estrés constituyen factores que pueden contribuir a la regulación de la ansiedad a través de mecanismos epigenéticos.

Además de las expresiones pasivas de ansiedad, se encontró una disminución del número de cruces en el LEC y de la actividad ambulatoria en general, es posible que la menor ambulación se relacione con los cambios

conductuales en el LEC, ya que estas conductas requieren de la motricidad. Sin embargo hasta ahora no se han relacionado cambios en la actividad locomotora con la expresión de *freezing*, que es evocada por estímulos eléctricos de intensidad moderada o alta.

Prolame y E₂ como fármacos con actividad ansiolítica en ratas AJ

En el LEC se encontró que el prolame incrementó el TBA en las ratas AJ-Ovx, que se reflejó como un menor TBC y mayor TC. El efecto ansiolítico de prolame se produjo de manera dependiente de la dosis, ya que a 60 µg/kg aumentó el TBA, sin embargo los efectos más robustos se observaron con la dosis alta (120 µg/kg), la cual aumentó el TBA y disminuyó el TBC y el TC. Por su parte, el tratamiento crónico con E₂ a dosis baja (40 µg/kg) duplicó el TBA, mientras que la dosis alta de E₂ careció de efecto ansiolítico en este modelo. Este último efecto puede ser considerado un efecto hormético como el que presentan muchos fármacos que actúan en el SNC, tales como los ansiolíticos y los antidepresivos, entre otros. El efecto hormético se caracteriza por una respuesta cuantitativa que alcanza un máximo de efecto en dosis intermedias, y posteriormente se pierde en dosis altas. Este efecto se produce de forma independiente del tipo de fármaco, la especie de animal utilizada y la conducta evaluada. Los resultados de E₂ encontrados aquí en relación a la pérdida de efecto ansiolítico en la dosis más alta utilizada (80 µg/kg) se han encontrado previamente en la prueba de nado forzado (Lemini et al., 2013) y en varias pruebas de ansiedad como en el modelo de transiciones luz/oscuridad, LEC y en el laberinto elevado en T, Walf y Frye, 2005).

Los estrógenos utilizados en este estudio no modificaron el #C totales en las hembras AJ-Ovx, lo que puede interpretarse como un efecto ansiolítico específico, es decir, que los cambios en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos/cerrados son independientes de la actividad locomotora general. Los resultados de la prueba de campo abierto dan sustento a esta afirmación.

Previamente, Nissen et al. (2012), administraron prolame (60 µg/kg) y E₂ (50 µg/kg) durante un mes a ratas hembra AJ, y encontraron que ambos tratamientos

reverten la ansiedad producida por la Ovx, al nivel de las hembras gonadalmente intactas. Por otro lado, Lemini et al. (2016), reportaron que la administración de prolame (60 mg/kg), en un esquema de tratamiento igual al del presente estudio (26 días), produjo efectos ansiolíticos en el LEC en hembras AJ-Ovx. Este efecto fue similar al producido por E₂ en una dosis equimolar (40 mg/kg) a la de prolame. Esos datos, al igual que los del presente estudio, proporcionan evidencia de que el tratamiento a largo plazo con prolame produce efectos ansiolíticos en el modelo de LEC.

En contraste con los resultados en el LEC, el prolame no produjo efectos ansiolíticos en el ED, considerando como parámetro el TE. Lemini et al. (2013), evaluaron el efecto de prolame, butolame y pentolame en ese modelo y encontraron que únicamente pentolame (70 mg/kg) disminuye la ansiedad en las hembras AJ-Ovx (Koob et al, 1998). Además, el pentolame produjo un efecto ansiolítico en el LEC mayor que el de E₂, prolame o butolame. Por lo anterior cabe la posibilidad de que el modelo de ED pueda discriminar la actividad ansiolítica de entre diferentes estrógenos. La diferencia podría explicarse por la relación estructura-actividad reportada en esos compuestos. Prolame posee 3C en la posición 17 del anillo D, mientras que pentolame tiene 5C en el sustituyente. Prolame y E₂ tienen afinidad equivalente por RE α y RE β , mientras que pentolame tiene una afinidad preferencial por los RE α (Lemus et al., 1998). En coincidencia, hasta ahora no se ha determinado un efecto ansiolítico de E₂ ni de prolame en el modelo de ED, reflejado en los principales parámetros (Martínez-Mota et al., 2000), lo que sugiere que el modelo es sensible a aquellos estrógenos con mayor actividad en los RE α . Esta hipótesis deberá confirmarse comparando las acciones ansiolíticas de los AEs con las de fármacos agonistas RE β y RE α y bloqueando sus efectos con los antagonistas respectivos.

Por otro lado, se ha descrito el efecto ansiolítico de E₂ en ratas de diferentes cepas. Walf & Frye (2010), encontraron que el tratamiento crónico con E₂ produce un efecto ansiolítico en ratas AJ de la cepa Long-Evans evaluadas en el LEC (0.09 mg/kg, una vez por semana, durante 14 semanas). En otro estudio (2009), estas

autoras evaluaron el efecto de E₂ (0.03 o 0.09 mg/kg, en el mismo esquema de administración) en ratas hembra de 8 semanas de edad, en el modelo de transición luz-oscuridad, encontrando que únicamente la dosis más alta de E₂ produjo un efecto ansiolítico, reflejado como un aumento en el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado. Kalandakanond-Thongsong, Daendee, & Srikiatkachorn (2012), también observaron un efecto ansiolítico de E₂ (10 µg/kg) en ratas hembra AJ en el laberinto elevado en T (reflejado en el aumento de la latencia de escape), el efecto se produjo con la administración crónica y aguda, sin embargo, fue más significativo en este último caso. Los resultados de esas investigaciones, aunados a los datos del presente estudio, sugieren que el efecto ansiolítico de E₂ depende del modelo utilizado. Las pruebas de ED y LEC miden diferentes tipos de ansiedad; en el primer caso, es necesario que el animal realice una conducta defensiva, mientras que en el LEC se aprovecha la conducta natural de exploración de los roedores a nuevos ambientes, lo cual podría generar condiciones de mayor sensibilidad a agentes hormonales con propiedades ansiolíticas.

Por lo anterior se puede interpretar que el efecto ansiolítico de E₂ y prolame depende del tipo de ansiedad que se induzca (Koob, Heinrichs & Britton, 1998). Sin embargo, no se puede descartar una interacción del modelo con la dosis y el esquema de tratamiento utilizados.

Efecto de prolame y E₂ en ratas de mediana edad

A diferencia de los efectos ansiolíticos observados en las ratas AJ, en las de ME ninguna dosis de E₂ o prolame incrementaron el TBA ni redujeron el TBC en el LEC. Esta respuesta se encontró en las hembras de ME-Ovx y en las de ME-Int, lo que refleja que la edad, más que la condición endocrina, impide o cancela la acción ansiolítica del prolame en este modelo.

En la prueba de ED tampoco se encontraron cambios en el TE ni en la LE, es decir, la principal conducta activa de ansiedad y el tiempo de reacción ante el estímulo estresante, respectivamente. Aunque esos resultados podrían sugerir una falta de efecto ansiolítico de los estrógenos, los datos del TF contradicen esta

propuesta. Ya que la conducta de *freezing* es una expresión pasiva ante eventos adversos que generan miedo o ansiedad, como los choques eléctricos del ED. El análisis estadístico mostró que el efecto de los tratamientos sobre el TF cambió de acuerdo a la edad/condición endocrina. Tales cambios fueron más evidentes y significativamente distintos en las ratas de ME-Int, en las cuales aumentó con las dosis bajas de cada uno de los tratamientos (E₂ a 40 µg/kg y prolame a 60 µg/kg), pero disminuyó a dosis altas (E₂ a 80 µg/kg y prolame a 120 µg/kg). Estos datos sugieren que las conductas asociadas al pánico, que son expresiones pasivas ante estresores, podrían ser moduladas por estrógenos de una forma dependiente de la dosis. Los datos también sugieren que el tratamiento con E₂ o prolame tiene una interacción con las hormonas endógenas presentes en las ratas de ciclos irregulares (ME-Int). El efecto bifásico de las dosis de prolame y E₂ no puede asociarse a niveles endógenos altos de E₂ u otra hormona, puesto que la mayoría de las hembras de ME-Int estuvieron en diestro al momento de la evaluación conductual. Esta fase se caracteriza por bajos niveles de E₂ y P4, sin embargo, se desconoce si se establece una interacción del tratamiento hormonal con los estrógenos, la P4 o con alguna otra hormona liberada bajo estas circunstancias.

Estudios en roedores han mostrado que la deficiencia de hormonas gonadales puede modificar los efectos de algunos psicofármacos. Por ejemplo Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti (2011), compararon el efecto de diazepam (0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg) en ratas de ME macho y hembra. Las hembras se evaluaron en la etapa de ciclos irregulares o diestro persistente. Los autores encontraron que la dosis más alta de diazepam disminuyó de manera significativa el número de animales que realizaron la conducta de enterramiento en ambos grupos. Aunado a esto, la dosis de 2.0 mg/kg fue la única que incrementó la inmovilidad y el *freezing* en los machos, y también indujo un efecto adverso en la prueba de rotarod (aumentando el número de caídas), lo que podría interpretarse como un efecto sedante, más que ansiolítico, estos efectos no se observaron en las hembras, estos resultados sugiere que el efecto de los tratamientos depende tanto del sexo como de los niveles hormonales presentes en el organismo. A diferencia de lo anterior, en el presente trabajo no se observó una disminución significativa en el número de

hembras que expresaron la conducta de enterramiento, mientras que como efecto adverso únicamente se podría reportar el producido por las dosis bajas de E₂ y prolame sobre el incremento del *freezing* en las hembras de ME, principalmente en aquellas que conservan los ovarios.

Por otro lado, en el análisis de animales que enterraron, Olvera-Hernandez & Fernandez-Guasti (2011), encontraron que los machos muestran menor ansiedad que las hembras. La expresión de conductas de ansiedad de las hembras de ME con ciclos irregulares del grupo control evaluadas en el estudio citado fueron mayores a los de las hembras con la misma condición endocrina en el presente trabajo. Esto podría atribuirse a la manipulación y el esquema de tratamiento, ya que ellos administraron de forma aguda.

De forma interesante, estudios como el de Walf & Frye (2010), reportan que la edad influye en el efecto ansiolítico del E₂: las hembras envejecidas responden de manera deficiente en comparación con las AJ, además, su respuesta depende del tiempo de privación hormonal. Es decir, si el tratamiento con E₂ comienza inmediatamente después de la supresión hormonal, el efecto ansiolítico o antidepressivo del estrógeno se mantiene. Sin embargo, si el inicio del tratamiento se retrasa, el efecto del mismo se reduce de manera importante. En el presente estudio se confirma parcialmente tal información, ya que ninguna de las dosis de E₂ fue efectiva para reducir la ansiedad en las ratas de ME, sin importar su condición endocrina, lo que sugiere que la edad es el factor crucial para cancelar el efecto del tratamiento. Esta conclusión parece extenderse al efecto de prolame en ratas de ME, las cuales están envejecidas, ya que en ninguno de los casos produjo efectos ansiolíticos en ratas de esta edad, aunque podría ejercer algunas acciones moduladoras de la conducta de pánico (*freezing*) en condiciones de estrés o ansiedad inducido por choques eléctricos.

Papel de los RE en el efecto ansiolítico de prolame y E₂ en hembras AJ vs de ME

Estudios recientes de imágenes cerebrales en rata demuestran que hay altos niveles de RE en la hipófisis, el hipotálamo, el núcleo de la cama de la estría terminal

y la amígdala, además la densidad de los RE es menor en la corteza cerebral y las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo (Khayum et al., 2016). Estudios de hibridación *in situ* muestran que los RE α están presentes en neuronas del núcleo hipotalámico ventromedial y el órgano subfornical, mientras las neuronas del bulbo olfatorio, el área tegmental ventral, el núcleo paraventricular y el cerebelo contienen exclusivamente RE β . Por otro lado, los RE α y RE β coexisten en neuronas del núcleo de la cama de la estría terminal, *locus coeruleus*, amígdala medial y cortical, sustancia gris periacueductal. La corteza y el hipocampo tienen neuronas con ambos subtipos de RE, pero predominan los RE β (Shughrue et al., 1997). Se ha demostrado que tanto el envejecimiento como la Ovx modulan la expresión de los RE en el cerebro, esta modulación en regiones como la amígdala y el hipocampo dan soporte a las diferencias de los efectos ansiolíticos de E₂ y prolame entre las hembras AJ y las de ME en el modelo de LEC, así como en el ED entre las de ME (Ovx e Int), reportados en la presente tesis.

Estudios previos comprueban que la expresión y cantidad de los RE es modulada por la edad y por la Ovx (Bean et al., 2015). Ambas condiciones reducen el número y la función de RE cerebrales, y en coincidencia se ha mostrado que los estrógenos pierden sus efectos psicoactivos conforme avanza el tiempo post-Ovx (Estrada-Camarena et al., 2011). Cuando las hembras AJ-Ovx iniciaron el tratamiento con los estrógenos tenían tres semanas post-Ovx, sin embargo esta latencia no puede explicar que éstos tratamientos hormonales tengan efecto en el LEC pero no en el modelo de ED.

Se ha propuesto la hipótesis de que la disminución en el número de RE β en las ratas envejecidas, podría estar asociado con el declive de los efectos psicoactivos en la memoria, la ansiedad, la depresión y la neuroprotección. Sin embargo, contrario a lo que se pensaba un estudio reciente demuestra una importante participación de los RE α hipocampales en los efectos conductuales del E₂ en ratas de esta edad (Bean et al., 2015). Con el envejecimiento también ocurre un declive en la cantidad de neuronas que expresan ambos subtipos de RE, en regiones como las CA1 y CA3 del hipocampo, así como una disminución en la

cantidad de receptores (proteína) en las mismas (Mehra et al., 2005). Estos receptores participan de manera importante en la regulación del estado de ánimo, la ansiedad y la memoria, por lo que su disminución podría subyacer a la falta de efecto ansiolítico de prolame y E₂ en las hembras de ME. Ya que las únicas diferencias entre los efectos de prolame y E₂ en ME-Int respecto a ME-Ovx se dieron en el TF, podemos sugerir que la presencia de los ovarios no es un factor que pudiera aumentar la respuesta de las hembras a los tratamientos con estrógenos, para producir un efecto ansiolítico contundente.

Posibles mecanismos de acción de los efectos ansiolíticos de prolame

El mecanismo de acción por el cual se producen los efectos ansiolíticos de prolame no se conoce, sin embargo datos de la literatura y de nuestro laboratorio sugieren que podría involucrar varios sistemas de neurotransmisión y otros mediadores de la comunicación neuronal. De acuerdo con un trabajo previo el efecto antidepressivo de prolame a 60 µg/kg y de E₂ a 30 µg/kg (3 días de administración) en ratas AJ-Ovx evaluadas en la prueba de nado forzado, es bloqueado por un tratamiento simultáneo con tamoxifeno (un antagonista de los RE), lo que sugiere que la vía inicial de acción de prolame involucra los RE (Lemini, Cruz-López y Martínez-Mota, 2013). Tamoxifeno es un antagonista inespecífico de los RE, así que con este estudio no es posible dirigir los efectos de prolame a su interacción con un tipo de RE en particular.

Por otro lado, Nissen et al. (2012) propusieron la hipótesis de que los efectos ansiolíticos y mnemónicos de prolame en un tratamiento de largo plazo similar al usado en la presente tesis, se debe a cambios en la neurotransmisión mediada por el óxido nítrico (ON). El ON participa en la señalización neuronal y procesos involucrados en la plasticidad sináptica, por lo que puede ser considerado uno de los mayores mecanismos celulares que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria, además, se sabe que el ON es capaz de facilitar la sinapsis en el hipocampo. La síntesis de ON por la óxido nítrico sintetasa (ONS) es regulada por estrógenos, a través de su participación en la modulación de los receptores ionotrópicos del neurotransmisor excitatorio glutamato (Anglemont, Campagne,

Steculorum y Prevot, 2009). El estudio de Nissen y colaboradores mostró que el tratamiento con prolame (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o E_2 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por cuatro semanas incrementó la expresión de la ONS en el hipocampo, y recuperó la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales de esta estructura, las cuales se habían reducido por efecto de la Ovx en las ratas AJ. Los autores sugieren que el tratamiento crónico con prolame facilita la vía del ON y que los cambios plásticos que ocurrieron en el hipocampo podrían subyacer a los efectos ansiolíticos de prolame.

Tampoco se puede descartar que el efecto ansiolítico de prolame se asocie con cambios en los sistemas de neurotransmisión de las monoaminas. Por un lado, nuestros estudios previos demostraron que los efectos antidepresivos de prolame podrían estar relacionados con la actividad de este estrógeno sobre las monoaminas. Prolame en tratamiento de 3 días produjo reducción de la conducta de inmovilidad junto con un aumento de la conducta de nado (Lemini 2013), mientras que el tratamiento crónico con este estrógeno produjo reducción de la inmovilidad junto con aumento de la conducta de escalamiento (Lemini 2016). Un gran número de artículos sustenta que el aumento de la conducta de nado es producido por fármacos con acciones sobre la 5-HT, en esta lista también se encuentra el E_2 (Cryan 2005; Estrada-Camarena et al., 2003; 2006). Mientras que el incremento de la conducta de escalamiento se produce por una facilitación del sistema de NA; el estrógeno sintético etinil-estradiol también tiene este mecanismo (Estrada-Camarena, López-Rubalcava, Vega-Rivera, Récamier-Carballo, Fernández-Guasti, 2010), por lo tanto, es posible sugerir que algunas acciones centrales de prolame son mediadas por la facilitación de sistemas como el de 5-HT y NA.

Si bien en la presente tesis se evaluaron los efectos ansiolíticos y no los antidepresivos de prolame, datos de la literatura sustentan que las mismas dosis y tratamientos de prolame (o de E_2) que son efectivos para inducir efecto ansiolítico son también efectivos para reducir la conducta depresiva, al menos en las ratas AJ-Ovx (Lemini 2016; datos del laboratorio tomados de las mismas ratas usadas en la presente tesis). Por lo tanto, es necesario poner a prueba las hipótesis con

experimentos específicos diseñados para elucidar la participación de las monoaminas en los efectos ansiolíticos de prolame.

2. EFECTOS DE PROLAME Y E₂ SOBRE LA ACTIVIDAD MOTRIZ

En el presente estudio se encontró que en los niveles basales, las ratas de ME-Int mostraron menor actividad ambulatoria que las AJ. El análisis estadístico mostró que la ambulación en las hembras evaluadas fue de la siguiente manera: AJ-Ovx > ME-OVX > ME-Int.

Se encontró que las ratas de ME (Ovx o intactas) realizaban menos conductas ambulatorias con respecto a las AJ, siendo el grupo de ME-Int el más afectado, en consecuencia se puede concluir que el envejecimiento deteriora la motricidad, especialmente en las hembras con irregularidad del ciclo estral. Es posible que la menor ambulación se relacione con los cambios conductuales en el LEC, ya que las hembras de ME presentaron menor número de cruces y permanecieron más tiempo en los brazos cerrados comparadas con las AJ. Hasta ahora no se han relacionado cambios en la actividad locomotora con la expresión de *freezing*, que es evocada por estímulos de intensidad moderada o alta.

En los animales AJ-Ovx, ninguno de los tratamientos modificó la actividad ambulatoria con respecto al control, lo que demuestra que la actividad ansiolítica de prolame y E₂ es específica. Sin embargo, al comparar los resultados entre los tratamientos, observamos que las hembras tratadas con E₂, muestran mayor actividad ambulatoria que las tratadas con prolame. En las ratas de ME-Ovx los tratamientos no modificaron la ambulación, y aunque en general mostraron menos actividad ambulatoria que las AJ, únicamente en los grupos tratado con E₂ a dosis de 80mg/kg se observó una diferencia significativa. En las hembras intactas, el tratamiento con E₂ en la dosis alta incrementó la actividad locomotora con respecto al vehículo, restaurándola a los niveles de los animales jóvenes con el mismo tratamiento. E₂ tiene acciones sobre el sistema dopaminérgico, lo que podría explicar este incremento de la actividad locomotora, sin embargo, con los resultados obtenidos no es posible afirmar que E₂ produjo acciones estimulantes ya que la

ambulaci3n alcanzada por las hembras de ME-Int no rebas3 la de las AJ-Ovx administradas con el veh3culo. A su vez, este cambio en la actividad motora inducido por E₂ en las ratas de ME, no impact3 otras conductas como la exploraci3n en el LEC ni la inmovilidad en la prueba de ED.

Este resultado, aunque debe interpretarse con cuidado, podr3a sugerir que el tratamiento con E₂ en ratas de ME-int, recupera algunos aspectos funcionales afectados por el envejecimiento, como es la locomoci3n en el modelo de CA, lo que podr3a considerarse un beneficio para hembras de esa edad.

3. EFECTO TR3FICO DE PROLAME Y E₂ SOBRE EL TEJIDO UTERINO

El 3tero de la rata est3 compuesto por dos cuernos, una base y un cuello. El tejido uterino est3 formado por tres capas: la mucosa glandular (endometrio), la capa muscular (miometrio) y la capa serosa (perimetrio). Las c3lulas epiteliales del 3tero proliferan en etapas como el proestro, en el cual incrementan significativamente los niveles de estr3genos, y se reducen (por apoptosis) en otras fases o etapas que se caracterizan por bajos niveles de estr3genos. Los RE α son f3cilmente detectables en las c3lulas epiteliales y musculares del 3tero, mientras que la presencia de RE β es controversial. Hay considerable evidencia de que los efectos de los estr3genos sobre el 3tero se deben a su interacci3n con RE α (Couse et al., 2006) en donde estimulan una mayor proliferaci3n celular, movilizaci3n de mol3culas de agua en las c3lulas, hiperemia (aumento de la irrigaci3n de un tejido) y producci3n y movilizaci3n de m3ltiples productos como alb3mina, electrolitos, productos del metabolismo de glucosa, etc (Course et al., 2006).

El tratamiento con E₂ aument3 de manera significativa el peso uterino con respecto al veh3culo en los tres grupos de edad; sin embargo, en las ratas AJ-Ovx fue m3s evidente, de 4-5 veces, mientras que en ratas de ME (Ovx e intactas) el efecto fue de poco m3s del doble. Entre las hembras de este 3ltimo grupo tambi3n se detectaron algunas diferencias atribuidas a la condici3n endocrina, ya que el peso de 3tero fue mayor en las ratas de ME-Int en comparaci3n con las de ME-Ovx.

En las hembras de ME-Int el efecto trófico fue dependiente de la dosis, ya que los cambios más significativos se observaron con la dosis de 80 µg/kg.

Por otra parte, prolame produjo efectos sobre el peso del útero en un sentido contrario, las ratas de ME-Int administradas con este AE fueron menos sensibles que las de ME-Ovx o las AJ-Ovx. Estos efectos no fueron diferentes en relación a la dosis.

Lemini et al. (2005b) realizaron un estudio en ratas y ratones hembra AJ para evaluar el efecto de E₂ y otros AE (prolame, butolame o pentolame) sobre el peso uterino, administrando los tratamientos por tres días, en un rango de dosis de 0.01 a 1000 µg/kg. El peso del útero se modificó de manera inversamente proporcional al grupo amino sustituido en el C-17, es decir, prolame fue más eficaz que pentolame. Los tres AE aumentaron el peso uterino en comparación con el tratamiento con vehículo; sin embargo, el efecto se produjo con menor potencia y eficacia que con el E₂.

Las acciones estrogénicas de los tratamientos aquí utilizados están mediadas por la activación de los RE. Los subtipos de RE α y β se encuentran distribuidos en diferentes proporciones a nivel periférico y central, además de que su expresión en tejidos o áreas del SNC es distinta, por ejemplo, los RE α predominan en tejidos periféricos como el útero (Gustafsson, 1999; Weiser et al., 2008). La baja afinidad de prolame por ambos RE hace que sea considerado un estrógeno débil, lo cual explica que el efecto trófico de E₂ sobre el peso uterino sea más potente que el de prolame (Walf y Frye, 2005).

Se ha encontrado una menor cantidad de RE α en el útero de ratas viejas, este cambio reduce la cantidad de sitios de unión para los ligandos, y reduce la eficacia de éstos. A su vez, algunos reportes muestran que el complejo formado por estrógeno-receptor en el citoplasma requiere una serie de procesos para trasladarse al núcleo e inducir sus efectos transcripcionales. Este proceso está deteriorado en hembras viejas de roedores (Haji et al., 1984) lo que conduciría a acciones menos eficientes para los ligandos que se unen al RE. Es posible que en las ratas de ME

usadas en este estudio exista tanto un declive en la cantidad de RE como una disminución de su función. Finalmente, se encontraron algunas diferencias entre las dos poblaciones de ratas viejas. Las hembras de ME-Int ganaron más peso uterino respecto a las hembras de ME-Ovx. Esto podría guardar relación con la capacidad de los ovarios para continuar secretando estrógenos (Wang et al., 1999), aun cuando la mayoría de las ratas se encontraban en la fase de diestro al momento de la extirpación de los ovarios. Los datos del presente estudio indican que el peso del útero podría estar asociado a la concentración de hormonas endógenas, ya que dicho tejido tuvo mayor peso en hembras de ME gonadalmente intactas respecto a las hembras ovariectomizadas AJ o de ME.

4. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LOS NIVELES DE E2 Y C

Con el fin de analizar una posible vía de acción para el efecto ansiolítico, se evaluó si el tratamiento con E₂ o prolame modifico las concentraciones de corticosterona en suero. Los resultados indican que las ratas expuestas a la batería de pruebas conductuales pero que recibieron únicamente vehículo, muestran niveles elevados de esa hormona. En general, las ratas de ME tuvieron niveles de corticosterona mayores que las AJ-Ovx, lo cual podría asociarse con la respuesta favorable de estas a los tratamientos en el LEC. Al respecto, se ha demostrado que las ratas con menor nivel de ansiedad son aquellas que tienen menor concentración de corticosterona, en comparación con las que exhiben mayor ansiedad (Walf y Frye 2005).

Sin embargo, la hipótesis anterior sólo puede ser sugerida, ya que es necesario demostrar con experimentos específicos la asociación entre los niveles de corticosterona y la conducta de ansiedad en los modelos aquí descritos. Por otra parte, los tratamientos con prolame o E₂ no redujeron de forma significativa la concentración de corticosterona en el suero de las ratas AJ, lo que sugiere que los efectos ansiolíticos de los tratamientos en esta población, no se asocian con cambios en el principal mediador periférico de la actividad del eje HHA. De manera similar, la corticosterona sérica en ratas de ME tampoco disminuyó por efecto de los tratamientos. Resultados similares fueron reportados por Lemini et al. (2016),

quienes reportan que el tratamiento crónico (26 días) con E₂, prolame, butolame o pentolame no modifica la concentración de corticosterona en ratas AJ-Ovx.

El efecto de los tratamientos sobre la concentración sérica de E₂ tampoco sugiere que la actividad ansiolítica de prolame y E₂ se deba a altos niveles de este estrógeno en suero. Por un lado, la administración de E₂ en ambas dosis incrementó de manera drástica la concentración de E₂ en suero, pero únicamente la dosis baja redujo la ansiedad en ratas AJ-Ovx evaluadas en el LEC. Por otro lado, prolame en ambas dosis aumentó de manera no significativa la concentración sérica de E₂, que se relacionó con la edad. En ratas AJ el tratamiento con prolame se asoció con niveles muy bajos de E₂ en suero (incluso más bajos que los encontrados en el grupo tratado con vehículo), y estas ratas respondieron con conducta ansiolítica en el LEC. Mientras que en las ratas de ME el prolame incrementó 2.5 veces los niveles de E₂ en suero respecto al grupo administrado con vehículo, pero no produjo efecto ansiolítica en el LEC. Tampoco es posible asociar los niveles séricos de E₂ con los efectos de prolame y E₂ sobre la conducta de *freezing*. En suma, los resultados sugieren que los efectos conductuales de E₂ en la conducta de ansiedad son independientes de su concentración periférica.

Los datos obtenidos en la presente tesis sugieren que en las ratas AJ-Ovx el prolame no se metaboliza a E₂, lo que podría ser un punto a favor del tratamiento de prolame como TRH. Otra posibilidad es que sí se convierta a E₂ pero que se degrade más rápidamente que en el organismo de las hembras de ME, las ratas fueron sacrificadas 30 min después de la última prueba conductual, por lo es posible que ya se haya producido la degradación de E₂. Esta idea es reforzada a partir de los resultados en las ratas de ME, las cuales tuvieron mayor concentración de E₂ en suero respecto a las jóvenes. Por lo que el metabolismo de esteroides y su asociación con el envejecimiento podría tener un papel en la concentración final de E₂ en las hembras tratadas con prolame.

Cabe sugerir que los niveles de E₂ dependan de factores como cambios en el metabolismo de esteroides asociados a la edad.

Los resultados de este estudio sugieren que el envejecimiento bloquea el efecto ansiolítico de los tratamientos utilizados, además prolame mostró una mejor eficacia respecto al E₂ para producir estos efectos centrales en las ratas AJ-Ovx pero con menos efectos adversos. Los hallazgos también muestran que el envejecimiento debilita las acciones ansiolíticas de prolame, y de E₂, y este efecto también se observa en el tejido uterino.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ Ni el envejecimiento ni la condición endocrina influyen de manera significativa en la presencia de ansiedad experimental en las hembras, evaluada en los modelos de LEC y ED.
- ✓ El envejecimiento deteriora el organismo de las ratas hembra, principalmente a nivel de la locomoción.
- ✓ La respuesta ansiolítica a los estrógenos prolame y E₂ depende de la edad, ya que producen los efectos esperados únicamente en las hembras adultas jóvenes.
- ✓ En las ratas de mediana edad E₂ y prolame modulan las conductas de pánico (freezing behavior) en respuesta a estímulos dolorosos. Este efecto dependió de la condición endócrina ya que tal modulación se presentó en las hembras intactas, pero no en las ovariectomizadas.
- ✓ El efecto ansiolítico de prolame o E₂ no se relaciona a alteraciones motoras.
- ✓ Los efectos tróficos de prolame sobre útero son menores a los de E₂, y no parecen estar relacionados a las concentraciones de estradiol en suero.
- ✓ Los niveles de corticosterona en respuesta a las pruebas de conducta fueron únicamente dependientes de la edad. El efecto de los tratamientos sobre la conducta no se relacionan con una reducción de los niveles de corticosterona en sangre.
- ✓ Los efectos ansiolíticos de E₂ y prolame no se relacionan con las concentraciones de estradiol en sangre.
- ✓ Los resultados sugieren que el envejecimiento en las hembras modifica el metabolismo de las hormonas esteroidales, como el prolame. Lo cual podría ser asociado a los niveles de E₂ encontrados en ratas de ME tratadas con el AE.

Por lo tanto, el 17β -aminoestrógeno prolamé, podrían ser una alternativa de TRH debido a que presenta efectos benéficos similares a los inducidos por el E_2 . Sin embargo, los efectos adversos que produce son menores de manera significativa, lo que podría redundar en una mejor calidad de vida de mujeres que debido a la menopausia, reciben este tipo de terapia.

X. PERSPECTIVAS

Se calcula que para el 2050 la pirámide de edad se invertirá (OMS), lo que indica que el número de mujeres en etapas como la perimenopausia y postmenopausia, en las cuales aumenta la vulnerabilidad a padecer trastornos psiquiátricos y en particular de la ansiedad. Por lo cual, es necesario invertir tiempo en investigar nuevos tratamientos que permitan mejorar su calidad de vida.

Los estrógenos utilizados en las TRH son una potente opción terapéutica, sin embargo, estos tratamientos conllevan distintos efectos deletéreos como el riesgo de padecer cáncer de útero/mama y los eventos tromboembólicos principalmente. Los AEs se han propuesto como una potente opción de TRH, aunado al efecto ansiolítico encontrado en el presente estudio, se ha reportado que prolame induce efectos anticoagulantes, antidepresivos, prosexuales, y mejora la memoria. Por lo que apoyamos la idea de seguir investigando sus propiedades farmacológicas.

Por lo tanto se propone evaluar los efectos ansiolíticos en una etapa más temprana de la vida, por ejemplo, en ratas que cursen el inicio de la etapa de ciclos irregulares.

Es necesario evaluar el tratamiento de prolame con diversos esquemas de administración y analizar posibles mecanismos de acción como aquellos en los que participan las monoaminas o los factores neurotróficos.

Sería interesante evaluar si el efecto ansiolítico de prolame depende de la interacción de este fármaco con los RE, e identificar el tipo de RE involucrado, y estudiar los mecanismos de acción propuestos.

XI. REFERENCIAS

- Adhikari, A. (2014). Distributed circuits underlying anxiety. *Front Behav Neurosci*, 8, 112. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00112
- Albert, K., Broadwell, C., & Newhose, P. (2011). Estrogen, menopause and mood regulation. *Menopausal Medicine*, 19(3), S8-S12.
- Altemus, M., Redwine, L. S., Leong, Y. M., Frye, C. A., Porges, S. W., & Carter, C. S. (2001). Responses to laboratory psychosocial stress in postpartum women. *Psychosom Med*, 63(5), 814-821.
- Anglemont de Tassigny X, Campagne C, Steculorum S, Prevot V. Estradiol induces physical association of neuronal nitric oxide synthase with NMDA receptor and promotes nitric oxide formation via estrogen receptor activation in primary neuronal cultures. *J Neurochem* 2009;109:214–24.
- APA. (2013). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM V* (5 ed.): Médica Panamericana.
- Arenas, M. C., & Puigcerver, A. (2009). Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología - Psychological Writings* 3(1), 20-29.
- Argyropoulos, S. V., Sandford, J. J., & Nutt, D. J. (2000). The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety. [Review]. *Pharmacol Ther*, 88(3), 213-227.
- Barrera, D., Avila, E., & Diaz, L. (2007). [Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy]. *Rev Invest Clin*, 59(2), 139-145.
- Benjet, C., Borges, G., Medina-Mora, M. E., Mendez, E., Fleiz, C., Rojas, E., & Cruz, C. (2009). Diferencias de sexo en la prevalencia y severidad de trastornos psiquiátricos en adolescentes de la Ciudad de México. *Salud Mental*, 32(2), 155-163.
- Berlanga, C., & Huerta, R. (2000). Los esteroides gonadales y la afectividad: el papel de las hormonas sexuales en la etiología y el tratamiento de los trastornos afectivos. *Salud Mental*, 23(4), 10-20.
- Berlanga, C., Mendieta, D., Alva, G., & del Carmen Lara, M. (2003). Failure of tibolone to potentiate the pharmacological effect of fluoxetine in

- postmenopausal major depression. *J Womens Health (Larchmt)*, 12(1), 33-39. doi: 10.1089/154099903321154121
- Bitran, D., Hilvers, R. J., & Kellogg, C. K. (1991). Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of gamma-aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav Neurosci*, 105(5), 653-662.
- Boehme, S., Ritter, V., Tefikow, S., Stangier, U., Strauss, B., Miltner, W. H., & Straube, T. (2014). Brain activation during anticipatory anxiety in social anxiety disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 9(9), 1413-1418. doi: 10.1093/scan/nst129
- Brann, D. W., & Mahesh, V. B. (2005). The aging reproductive neuroendocrine axis. *Steroids*, 70(4), 273-283.
- Brunton, L., Chabner, B., & Knollman, B. (2012). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (12 ed.): McGraw Hill.
- Cushman, M., Kuller, L. H., Prentice, R., Rodabough, R. J., Psaty, B. M., Stafford, R. S., . . . Women's Health Initiative, I. (2004). Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis *JAMA*, 292(13), 1573-1580. doi: 10.1001/jama.292.13.1573
- Charney, D. S., Woods, S. W., Goodman, W. K., & Heninger, G. R. (1987). Serotonin function in anxiety. II. Effects of the serotonin agonist MCPP in panic disorder patients and healthy subjects. *Psychopharmacology (Berl)*, 92(1), 14-24.
- Chirino, R., Fernandez, L., Torres, S., & Navarro, D. (2004). Fisiología reproductiva femenina: hormonas sexuales y sus ciclos *Biocáncer*, 2.
- Dalbert, D. (1997). Enfoque holístico del climaterio. *Nuestro Hospital*(2).
- De Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol*, 463(1-3), 145-161.
- Duval, F., Mokrani, M. C., Gonzalez, L. F., Alexa, C., Rabia, H., Proudnikova, X., & Erb, A. (2010). Difference between morning and evening thyrotropin response to protirelin (TRH) and prediction of antidepressant treatment outcome in major depression. In N. Gotsiridze-Columbus (Ed.), *Hormones and Behavior* (pp. 85-104). New York: Nova Science.

- Espey, L., & Richards, J. (2006). Ovulation *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3 ed., pp. 425-474): Elsevier.
- Estrada-Camarena, E., Fernandez-Guasti, A., & Lopez-Rubalcava, C. (2003). Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 28(5), 830-838. doi: 10.1038/sj.npp.1300097
- Estrada-Camarena, E., Lopez-Rubalcava, C., Vega-Rivera, N., Recamier-Carballo, S., & Fernandez-Guasti, A. (2010). Antidepressant effects of estrogens: a basic approximation. *Behav Pharmacol*, 21(5-6), 451-464. doi: 10.1097/FBP.0b013e32833db7e9
- Farquhar, C., Marjoribanks, J., Lethaby, A., Suckling, J. A., & Lamberts, Q. (2009). Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD004143. doi: 10.1002/14651858.CD004143.pub3
- Fernandez-Guasti, A., Fiedler, J. L., Herrera, L., & Handa, R. J. (2012). Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Horm Metab Res*, 44(8), 607-618. doi: 10.1055/s-0032-1312592
- Fernandez-Guasti, A., Martinez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Contreras, C. M., & Lopez-Rubalcava, C. (1999). Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav*, 63(1), 13-20.
- Fernandez, J. M., Rubio-Arroyo, M. F., Soriano-Garcia, M., Toscano, R. A., & Perez-Cesar, M. C. (1985). Synthesis and molecular structure of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 beta-yl)-3-hydroxypropylamine; an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids*, 45(2), 151-157.
- Flores-Ramos, M., & Martinez-Mota, L. (2012). Perimenopausia y trastornos afectivos aspectos básicos y clínicos. *Salud Mental*, 3(5), 231-240.
- Freeman, E. W., Sammel, M. D., Lin, H., & Nelson, D. B. (2006). Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no

- history of depression. *Arch Gen Psychiatry*, 63(4), 375-382. doi: 10.1001/archpsyc.63.4.375
- Frye, C. A. (2009). Steroids, reproductive endocrine function, and cognition. A review. *Minerva Ginecol*, 61(6), 563-585.
- Frye, C. A., & Walf, A. A. (2004). Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. *Behav Neurosci*, 118(2), 306-313. doi: 10.1037/0735-7044.118.2.306
- Frye, C. A., Walf, A. A., & Paris, J. J. (2010). Conjugated equine estrogen, with medroxyprogesterone acetate, enhances formation of 5alpha-reduced progestogens and reduces anxiety-like behavior of middle-aged rats. *Behav Pharmacol*, 21(5-6), 530-539. doi: 10.1097/FBP.0b013e32833e0a23
- George, D. T., Nutt, D. J., Rawlings, R. R., Phillips, M. J., Eckardt, M. J., Potter, W. Z., & Linnoila, M. (1995). Behavioral and endocrine responses to clomipramine in panic disorder patients with or without alcoholism. *Biol Psychiatry*, 37(2), 112-119. doi: 10.1016/0006-3223(94)00156-W
- Goldberg, M. R., Hollister, A. S., & Robertson, D. (1983). Influence of yohimbine on blood pressure, autonomic reflexes, and plasma catecholamines in humans. *Hypertension*, 5(5), 772-778.
- Gomez, C., Saldivar, J. A., & Rodriguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1), 14-24.
- Gustafsson, J. A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol*, 163(3), 379-383.
- Hall, J. E. (2004). Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 33(4), 637-659. doi: 10.1016/j.ecl.2004.08.002
- Handa, R. J., & Weiser, M. J. (2014). Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol*, 35(2), 197-220. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.11.001
- Harris, H. A., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (2002). Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha

- and ERbeta, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERalpha-selective ligand. *Endocrinology*, 143(11), 4172-4177. doi: 10.1210/en.2002-220403
- Heinze, G. (2003). La ansiedad: cómo se la concibe actualmente. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencia*, 54(2), 8-15.
- Huerta, F. (2000). El estado de ánimo de la mujer durante su ciclo reproductivo. *Salud Mental*, 23(3), 52-60.
- Jaimez, R., Cooney, A., Jackson, K., Lemus, A. E., Lemini, C., Cardenas, M., . . . Larrea, F. (2000). In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17beta-aminoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73(1-2), 59-66.
- Jensvold, M. F. (1995). Non pregnant reproductive-age women, Part I: The menstrual cycle and psychopharmacology. In M. F. Jensvold, U. Halbreich & J. A. Hamilton (Eds.), *Psychopharmacology and women* (pp. 139-170): American Psychiatric Press.
- Kahn, R. J., McNair, D. M., Lipman, R. S., Covi, L., Rickels, K., Downing, R., . . . Frankenthaler, L. M. (1986). Imipramine and chlordiazepoxide in depressive and anxiety disorders. II. Efficacy in anxious outpatients. *Arch Gen Psychiatry*, 43(1), 79-85.
- Kalandakanond-Thongsong, S., Daendee, S., & Srikiatkachorn, A. (2012). Effect of the acute and chronic estrogen on anxiety in the elevated T-maze. *Physiol Behav*, 105(2), 357-363. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.08.034
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods*, 143(2), 169-177. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.001
- Khanna, J. M., Kalant, H., Chau, A., & Shah, G. (1998). Rapid tolerance and crosstolerance to motor impairment effects of benzodiazepines, barbiturates, and ethanol. *Pharmacol Biochem Behav*, 59(2), 511-519.
- Koob, H. (1998). *Animal models of anxiety disorders* (2 ed.).

- Lemini, C., Cruz-Lopez, B., & Martinez-Mota, L. (2013). Participation of estrogen receptors in the antidepressant-like effect of prolame on the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav*, 103(3), 659-665. doi: 10.1016/j.pbb.2012.11.004
- Lemini, C., Franco, Y., Avila, M. E., & Jaimez, R. (2005a). Contrasting effects of estradiol and 17 beta-aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur J Pharmacol*, 510(3), 229-233. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.01.027
- Lemini, C., Franco, Y., Avila, M. E., & Jaimez, R. (2005b). Estrogenic effects of 17 beta-aminoestrogens assessed in uteri of rats and mice. *Eur J Pharmacol*, 510(3), 235-239. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.01.028
- Lemini, C., Garcia-Albor, E., Cruz-Lopez, B., Matamoros-Trejo, G., & Martinez-Mota, L. (2016). Differential effect of the 17beta-aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 64, 102-108. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.013
- Lemus, A. E., Jaimez, R., Lemini, C., Menjivar, M., Silva, G., Rubio-Poo, C., . . . Larrea, F. (1998). Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen 17 beta-(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame). *Steroids*, 63(7-8), 433-438.
- Limon, D., Diaz, A., Hernandez, M., Fernandez, G. J., Torres-Martinez, A. C., Perez-Severiano, F., . . . Guevara, J. (2012). Neuroprotective effect of the aminoestrogen prolame against impairment of learning and memory skills in rats injected with amyloid-beta-25-35 into the hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 685(1-3), 74-80. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.04.020
- Locia, J., Soto, A., Manzo, J., & Hernandez, A. (2008). Receptores a estrógenos α y β en células normales y cancerígenas. *La Ciencia y el Hombre. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 21(1).
- Loose, D., & Stancel, G. (2006). Estrógenos y Progestágenos. In M. Hill (Ed.), *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (11 ed., pp. 1541-1572). Colombia.

- Lopez-Rubalcava, C., Fernandez-Guasti, A., & Urba-Holmgren, R. (1996). Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT_{1A} compounds. *Dev Psychobiol*, 29(2), 157-169. doi: 10.1002/(SICI)1098-2302(199603)29:2<157::AID-DEV5>3.0.CO;2-R
- Louie, A. K., Lannon, R. A., & Ketter, T. A. (1989). Treatment of cocaine-induced panic disorder. [Case Reports Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Am J Psychiatry*, 146(1), 40-44. doi: 10.1176/ajp.146.1.40
- Lu, K. H., Hopper, B. R., Vargo, T. M., & Yen, S. S. (1979). Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod*, 21(1), 193-203.
- Lugones, M. (2006). La terapia hormonal de reemplazo y la prevención cardiovascular en la menopausia. Principales estudios realizados y sus resultados. *Rev. Cubana Obstet Ginecol*, 32(2).
- Lydiard, R. B. (2003). The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry*, 64 Suppl 3, 21-27.
- Maranon, G. (1924). Contribution a l'etude de l'action emotive de l'adrenaline. *Revue Francaise d'Endocrinologie*, 2, 301-325.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, 74(4-5), 435-440.
- Marin, R., Guerra, B., Alonso, R., Ramirez, C. M., & Diaz, M. (2005). Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection. *Curr Neurovasc Res*, 2(4), 287-301.
- Martinez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Lopez-Rubalcava, C., Contreras, C. M., & Fernandez-Guasti, A. (2000). Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 25(2), 109-120.
- Martínez-Mota, L., Ulloa, R.E., Herrera-Pérez, J., Chavira, R., Fernández-Guasti, A., 2011. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiol. Behav.* 104 (5), 900–905.

- Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*, 70(2), 83-244.
- Montelongo, R., Lara, A. C., Morales, B., & Villaseñor, B. (2005). Los trastornos de ansiedad. *Revista Digital Universitaria*, 6(11).
- Mounier, B., Pons, B., Delavenne, X., Beyens, M. N., Remy, C., Zeni, F., . . . Basset, T. (2012). *Therapie*, 67(2), 183-189. doi: 10.2515/therapie/2012019
- Neal-Perry, G., Nejat, E., & Dicken, C. (2010). The neuroendocrine physiology of female reproductive aging: An update. *Maturitas*, 67(1), 34-38. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.04.016
- Nelson, H. D., Humphrey, L. L., Nygren, P., Teutsch, S. M., & Allan, J. D. (2002). Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA*, 288(7), 872-881.
- Nesse, R. M., Cameron, O. G., Curtis, G. C., McCann, D. S., & Huber-Smith, M. J. (1984). Adrenergic function in patients with panic anxiety. *Arch Gen Psychiatry*, 41(8), 771-776.
- Nissen, I., Estrada, F. S., Nava-Kopp, A. T., Irlles, C., de-la-Pena-Diaz, A., Fernandez, G. J., . . . Zhang, L. (2012). Prolame ameliorates anxiety and spatial learning and memory impairment induced by ovariectomy in rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Physiol Behav*, 106(2), 278-284. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.02.019
- Nutt, D. J., Ballenger, J. C., Sheehan, D., & Wittchen, H. U. (2002). Generalized anxiety disorder: comorbidity, comparative biology and treatment.. *Int J Neuropsychopharmacol*, 5(4), 315-325. doi: 10.1017/S1461145702003048
- Nutt, D. J., & Cowen, P. J. (1987). Diazepam alters brain 5-HT function in man: implications for the acute and chronic effects of benzodiazepines.. *Psychol Med*, 17(3), 601-607.
- O'Connor, L. H., Nock, B., & McEwen, B. S. (1988). Regional specificity of gamma-aminobutyric acid receptor regulation by estradiol.. *Neuroendocrinology*, 47(6), 473-481.

- Olvera-Hernandez, S., & Fernandez-Guasti, A. (2011). Sex differences in the burying behavior test in middle-aged rats: effects of diazepam. *Pharmacol Biochem Behav*, 99(4), 532-539. doi: 10.1016/j.pbb.2011.05.030
- OMS. (2000). *Guía de Bolsillo de la Clasificación CIE-10 Clasificación de los trastornos mentales y del comportamiento* (10 ed.). España.
- OMS. (2005). Informe sobre la salud en el mundo 2005. Ginebra.
- Ordi-Ros, J., & Cosiglio, F. J. (2014). [Current therapeutic indications of thalidomide and lenalidomide]. *Med Clin (Barc)*, 142(8), 360-364. doi: 10.1016/j.medcli.2013.04.038
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3), 149-167.
- Perna, G., Dacco, S., Menotti, R., & Caldirola, D. (2011). Antianxiety medications for the treatment of complex agoraphobia: pharmacological interventions for a behavioral condition. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 7, 621-637. doi: 10.2147/NDT.S12979
- Pinel, J., & Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(4), 708-712.
- Rainey, J. M., Jr., Pohl, R. B., Williams, M., Knitter, E., Freedman, R. R., & Etedgui, E. (1984). A comparison of lactate and isoproterenol anxiety states. *Psychopathology*, 17 Suppl 1, 74-82.
- Redmond, D. E. (1985). Neurochemical basis of anxiety and anxiety disorders: Evidence from drugs which decrease human fear or anxiety. In A. H. Thouma & J. D. Maser (Eds.), *Anxiety and Anxiety Disorders* (pp. 530-555): Erlbaum.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., & Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*, 30(3), 289-304.
- Rogel-Salazar, G., & Lopez-Rubalcava, C. (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_{1A} receptors. *Behav Pharmacol*, 22(2), 136-146. doi: 10.1097/FBP.0b013e328343d7c5

- Rossouw, J., Bray, P., Liu, J., Kooperberg, C., Hsia, J., Lewis, C., . . . Herrington, D. (2011). Estrogen receptor polymorphisms and the vascular effects of hormone therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(2), 464-469. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215087
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., . . . Writing Group for the Women's Health Initiative, I. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3), 321-333.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., . . . Mohler, H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, 401(6755), 796-800. doi: 10.1038/44579
- Salomon, J. A., Vos, T., Hogan, D. R., Gagnon, M., Naghavi, M., Mokdad, A., . . . Jonas, J. B. (2012). Common values in assessing health outcomes from disease and injury: disability weights measurement study for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380(9859), 2129-2143. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61680-8
- Sandford, J. J., Argyropoulos, S. V., & Nutt, D. J. (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology.. *Pharmacol Ther*, 88(3), 197-212.
- Sibolboro Mezzacappa, E., Tu, A. Y., & Myers, M. M. (2003). Lactation and weaning effects on physiological and behavioral response to stressors.. *Physiol Behav*, 78(1), 1-9.
- Smith, A., & Nutt, D. (1996). Noradrenaline and attention lapses. *Nature*, 380(6572), 291. doi: 10.1038/380291a0
- Soares, C. N., & Zitek, B. (2008). Reproductive hormone sensitivity and risk for depression across the female life cycle: a continuum of vulnerability? [Review]. *J Psychiatry Neurosci*, 33(4), 331-343.

- Soules, M. R., Sherman, S., Parrott, E., Rebar, R., Santoro, N., Utian, W., & Woods, N. (2001a). Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril*, *76*(5), 874-878.
- Soules, M. R., Sherman, S., Parrott, E., Rebar, R., Santoro, N., Utian, W., & Woods, N. (2001b). Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Climacteric*, *4*(4), 267-272.
- Starcevic, V. (2012). Reconsidering benzodiazepines in the treatment of panic disorder. *Aust N Z J Psychiatry*, *46*(3), 271-272. doi: 10.1177/0004867411433969
- Tallman, J. F., Casella, J., & Kehne, J. (2002). Mecanism of action of anxiolytics. *Neuropsychopharmacology*, *68*, 994-1015.
- Tancer, M. E., Mailman, R. B., Stein, M. B., Mason, G. A., Carson, S. W., & Golden, R. N. (1994). Neuroendocrine responsivity to monoaminergic system probes in generalized social phobia. *Anxiety*, *1*(5), 216-223.
- Treit, D., Menard, J., & Royan, C. (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*, *44*, 463-469.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2005). Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoendocrinology*, *34*(6), 909-916.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2006). A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology*, *31*(6), 1097-1111. doi: 10.1038/sj.npp.1301067
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2009). Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. *Gen Med*, *6*(1), 300-311. doi: 10.1016/j.genm.2009.04.004
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2010). Raloxifene and/or estradiol decrease anxiety-like and depressive-like behavior, whereas only estradiol increases carcinogen-induced tumorigenesis and uterine proliferation among ovariectomized rats. [Research Support, N.I.H., Extramural. *Behav Pharmacol*, *21*(3), 231-240.
- Walf, A. A., Koonce, C., Manley, K., & Frye, C. A. (2009). Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better

- performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze.
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Behav Brain Res*, 196(2), 254-260. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.016
- Walf, A. A., Paris, J. J., & Frye, C. A. (2009). Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Psychoneuroendocrinology*, 34(6), 909-916. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.01.004
- Walf, A. A., Rhodes, M. E., & Frye, C. A. (2004). Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test.. *Pharmacol Biochem Behav*, 78(3), 523-529. doi: 10.1016/j.pbb.2004.03.023
- Warren, M. P. (2007). Historical perspectives in postmenopausal hormone therapy: defining the right dose and duration. *Mayo Clin Proc*, 82(2), 219-226. doi: 10.4065/82.2.219
- Weiser, M. J., Foradori, C. D., & Handa, R. J. (2008). Estrogen receptor beta in the brain: from form to function. *Brain Res Rev*, 57(2), 309-320. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.05.013
- Yabur, J. A. (2006). La menopausia puesta al día. *Gac Méd Caracas*, 114(1).

XII. APÉNDICE

PUBLICACIÓN

Lemini C, **García-Albor**, Cruz-López, Matamoros-Trejo y Martínez-Mota.
Differential effect of the 17 β -aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 64:102-8, 2016.

PARTICIPACION EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

Ponencias

García-Albor Erika, Lemini Cristina, Martínez-Mota Lucía. Evaluación del efecto tipo ansiolítico del 17 β -aminoestrógeno prolame en un modelo animal de perimenopausia. IV Coloquio de Psicología Fisiológica y Experimental, Facultad de Psicología, UNAM. México D.F. del 30 de septiembre al 2 de octubre de 2013.

Carteles

1. **García-Albor Erika**, Cruz-López, Matamoros-Trejo Gilberto, Lemini Cristina, Martínez Mota Lucia. "EVALUACIÓN DEL EFECTO TIPO ANSIOLÍTICO Y ANTIDEPRESIVO DE LOS 17 β -AES PROLAME, BUTOLAME Y PENTOLAME". XII Concurso de carteles, de la XXIX Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, México D. F., octubre de 2014.

2. **García-Albor Erika**, Cruz-López, Matamoros-Trejo Gilberto, Lemini Cristina, Martínez Mota Lucia. "EVALUACION DEL EFECTO ANSIOLÍTICO Y ANTIDEPRESIVO DE LOS 17 β -AES PROLAME, BUTOLAME, Y PENTOLAME". LVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Oaxaca, Oax., México, del 31 de agosto al 4 de septiembre de 2014.

3. **Erika García Albor**, Beatriz Cruz López, Cristina Lemini, Lucia Martínez Mota. "EL ENVEJECIMIENTO MODIFICA EL EFECTO TIPO ANSIOLÍTICO DEL 17 β -AMINOESTRÓGENO PROLAME". XII Concurso de carteles, de la XXVIII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, México D. F., septiembre de 2013.

4. Martínez-Mota L, **García-Albor E**, Cruz-López B, Valdés-Cruz A, Lemini C. EL ENVEJECIMIENTO BLOQUEA EL EFECTO TIPO ANSIOLÍTICO DEL 17 β -AE PROLAME EN RATA HEMBRA". 56° Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. SMCF, Tlaxcala, Tlax., México, septiembre de 2013.

5. Erika García Albor, Beatriz Cruz López, Cristina Lemini, Lucia Martínez Mota. EVALUACIÓN DEL EFECTO TIPO ANSIOLÍTICO Y ANTIDEPRESIVO DEL 17 β -AMINOESTRÓGENO PROLAME, en un modelo animal de perimenopausia. X Encuentro Participación de la mujer en la ciencia, León, Gto, México, mayo de 2012.

6. Beatriz Cruz López, **Erika García Albor**, Cristina Lemini, Lucia Martínez Mota. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS EN EL EFECTO TIPO ANTIDEPRESIVO DE PROLAME EN LA PRUEBA DE NADO FORZADO. X Encuentro Participación de la mujer en la ciencia, León, Gto, México, mayo de 2012.

Trabajos en extenso

1. Erika García Albor, Beatriz Cruz López, Cristina Lemini, Lucia Martínez Mota. EVALUACIÓN DEL EFECTO TIPO ANSIOLÍTICO Y ANTIDEPRESIVO DEL 17 β -AMINOESTRÓGENO PROLAME EN UN MODELO ANIMAL DE PERIMENOPAUSIA. X Encuentro Participación de la mujer en la ciencia, León, Gto, México, mayo de 2012.

2. Beatriz Cruz López, **Erika García Albor**, Cristina Lemini, Lucia Martínez Mota. PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS EN EL EFECTO TIPO ANTIDEPRESIVO DE PROLAME EN LA PRUEBA DE NADO FORZADO. X Encuentro Participación de la mujer en la ciencia, León, Gto, México, mayo de 2012.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Differential effect of the 17 β -aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats

C. Lemini^a, E. García-Albor^b, B. Cruz-López^b, G. Matamoros-Trejo^c, L. Martínez-Mota^{b,*}^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad No. 3000, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510 México, D.F., Mexico^b Laboratorio de Farmacología Conductual, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, C.P. 14370 México, D.F., Mexico^c Laboratorio de Neurofisiología Molecular, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, C.P. 14370 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2015

Received in revised form 23 July 2015

Accepted 30 July 2015

Available online 31 July 2015

Keywords:

17 β -Aminoestrogens

Animal models

Anxiety

Depression

Hormone replacement therapy

ABSTRACT

Estrogens of clinical use produce consistent antidepressant- and anxiolytic-like effects in animal models of menopause. Regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) or stress axis, has been proposed as a pathway through which estrogens improve affective-like behaviors. Anticoagulant 17 β -aminoestrogens (17 β -AEs) butolame and pentolame mimic some effects of estradiol (E₂), i.e., on female rodent sexual behavior, with opposite actions on coagulation. However, their psychoactive actions have not been explored. On the basis of similitude with E₂'s effects, we hypothesized that these 17 β -AEs would induce anxiolytic- and antidepressant-like effects, which would be reflected in a reduction of activity in the HPA axis. In ovariectomized female rats, chronic treatment with prolame (60 μ g/kg), butolame (65 μ g/kg) and pentolame (70 μ g/kg) reduced anxiety-like behavior in the elevated plus maze (evidenced by an increase in time in open arms, E₂ (40 μ g/kg) + 176%; prolame + 201%; butolame, + 237%; and pentolame + 295%, in comparison to the control vehicle group 100%). Pentolame also decreased significantly anxiety-like behavior in the burying behavior test. Prolame and E₂ produced a significantly antidepressant-like action, which was not induced by butolame and pentolame. Behavioral effects of 17 β -AEs (and E₂) on anxiety and depression did not follow the same pattern than corticosterone or E₂ levels; they also were associated to changes in locomotor activity, evaluated by the open field test. These results constitute the first evidence of specific and selective actions of butolame and pentolame as anxiolytics for females with a hypoestrogenic condition. Results also confirm the potential of prolame as an antidepressant steroid with equivalent actions to E₂. Psychoactive properties of 17 β -AEs in combinations with reduced adverse effects on coagulation, suggest that 17 β -AEs may be a good alternative replacement therapy for women with symptoms associated with menopause.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Recent studies investigating affective processes in humans have observed higher rates of mood and anxiety disorders in pathologies related with abnormalities in gonadal hormone levels (Rasgon et al., 2002). In women during menopause transition, diminishing ovarian function gradually leads to decreases of 17 β -estradiol (E₂) levels. Such status is linked to physical (i.e., hot flushes) and psychological (i.e., changes in mood) symptoms (Llaneza et al., 2012). Extreme manifestations of anxiety and sadness in women with risk factors, may lead to the

diagnosis of anxiety and depressive disorders impacting their quality of life (Terauchi et al., 2013).

Traditional psychiatric drugs may improve affective alterations of menopausal women (Morgan et al., 2005); however, the complex symptoms due to the lack of gonadal hormones sometimes require the use of estrogen replacement therapy (ERT). ERT has benefits on metabolism, hot flushes and insomnia (Llaneza et al., 2012), improves mood alterations and reduces anxiety in some women (Rasgon et al., 2002; Soares et al., 2001). Importantly, ERT may modulate hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis function (Kudielka et al., 1999; Pattacchioli et al., 2006) exerting its antidepressant and anxiolytic effects in women. However, adverse effects of ERT such as an increased risk of breast or endometrial cancer and thromboembolic events (Farquhar et al., 2009; Narod, 2011), limits its use in high risk populations for these diseases.

Rodent models have been extensively used and have made an important contribution on better understanding ERT's effects on

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Delegación Tlalpan, C.P. 14370 México, D.F., Mexico.

E-mail address: lucia@imp.edu.mx (L. Martínez-Mota).

anxiety- or depressive-like behaviors and its underlying mechanisms (Estrada-Camarena et al., 2010; Walf and Frye, 2005a). Estrogen actions on affective-like behavior are influenced by many factors. Estrogens like E_2 and ethynilestradiol produce consistent antidepressant-like effects in hypoestrogenic female rodents, with some variation in efficacy related to dosage (Estrada-Camarena et al., 2003; Walf and Frye, 2005a). Their effects on anxiety are more controversial even in animal models. Conflicting results seem be linked to the type of estrogen evaluated, but more importantly to the regimen (Hiroi et al., 2011; Kalandakanond-Thongsong et al., 2012). Considering the advantages of ERTs, there continues to be interest in finding new estrogenic molecules with an adequate balance between benefits and risks. Effects of these molecules on affective regulation are investigated from a basic approach in validated animal models of anxiety- or depressive-like behaviors.

The synthetic 17β -aminoestrogens (17β -AEs), prolame [17 β -(3-hydroxy-1-propylamino)-1,3,5(10)-(estratrien-3-ol)], butolame [17 β -(3-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol], and pentolame [17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] are E_2 analogs with an amino-alcohol side chain $-NH-(CH_2)_n-OH$ substituent in the C17 position of the steroid nucleus (Fig. 1). 17β -AEs in ovariectomized (Ovx) rodents produce effects on uterus, brain, and stimulate sexual behavior similarly to E_2 , but with lower efficacy and potency (Jaimez et al., 2000; Lemini and Canciola, 2009; Lemini et al., 2005b). Interestingly, 17β -AEs induce anticoagulant effects, in contrast to the procoagulant effect of E_2 (Lemini et al., 2005a), which may have implications for their use as ERT in women with increased risk of thromboembolic events.

Recent studies in behavioral paradigms have reported that prolame has psychoactive actions, similar to E_2 . Prolame induces mnemonic, anxiolytic-like (Limón et al., 2012), and antidepressant-like effects in Ovx females (Lemini et al., 2013). Butolame and pentolame have a close structural relationship to prolame, but differences in the length of chain substituent (Jaimez et al., 2000) account for less adverse effects on coagulation and in the uterus (Lemini et al., 2005a,b). However their psychoactive effects have been scarcely investigated in animal models of affective disorders.

This study tested the hypothesis that treatment with butolame and pentolame would produce antidepressant- and anxiolytic-like effects similar to the natural hormone (E_2). We predicted that these effects would be associated to a chronic administration regimen rather than a subacute one (Koss et al., 2004; Lemini et al., 2013). Considering the psychoactive effects of E_2 could be related to an adequate stress response, it was expected that 17β -AEs' actions on behavior were associated with reduction of corticosterone (B) levels in blood. Accordingly, the objectives of this study were: a) to evaluate whether chronic administration of butolame or pentolame produce anxiolytic- and/or antidepressant-like effects in validated animal models of affective disorders; b) to determine possible unspecific effects of steroids on ambulation by using the open field test (OFT); c) to relate behavioral effects of 17β -AEs with serum levels of B; and d) to investigate if behavioral effects of 17β -AEs were linked to production of E_2 levels.

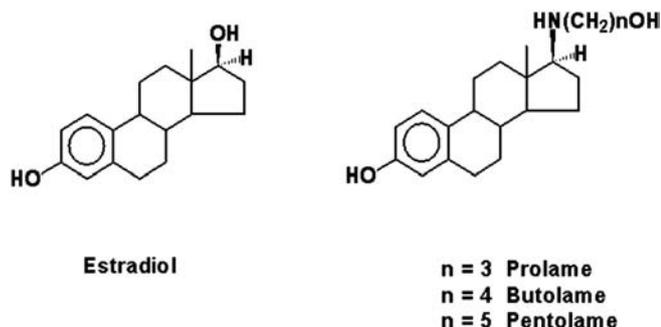


Fig. 1. Structure of 17β -estradiol and 17β -AEs.

2. Methods

2.1. Animals

Female adult Wistar rats weighing 200–250 g were used in this study. All animals were bred in the animal housing facilities of the Faculty of Medicine, UNAM; treated and evaluated in the National Institute of Psychiatry “Ramón de la Fuente Muñiz”. The animals were housed, five per cage, in a room under inverted light/dark cycle conditions (12/12 h; lights on at 22:00 h) with ad libitum access to water and Purina Rat Chow throughout the experiments. Institutional ethical committees for animal use approved the protocol for these experiments (No. 058-2014 and No. NC143370.1). Animal management was done according to the general principles of laboratory animal care (NIH publication 85-23, 1985, cited in National Research Council, 2011). Experimental studies were conducted in accordance with Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999, the Animal Protection Law for the Federal District and the General Health Law Related to Health Research (2001).

2.2. Surgery

Rats were bilaterally Ovx under anesthesia with 2,2,2-tribromoethanol (Fluka, 100 mg/kg i.p., dissolved in 0.9% saline solution) and kept in aseptic conditions. Afterwards, the rats were returned to their home cages to allow recovery for three weeks, before treatment administration (Lemini et al., 2013).

2.3. Drugs

Prolame, butolame and pentolame were synthesized from estrone. The detailed process for the synthesis of these 17β -AEs is described elsewhere (Fernandez-G et al., 1985). Substances were subjected to proof of chemical purity by comparing their analytical (MP, TLC) and spectroscopic methods (IR, NMR, MS) with the authentic samples. E_2 (3,17 β -dihydroxy-1,3,5(10)-estratriene) was purchased in Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). All steroids were dissolved in corn oil.

2.4. Behavioral tests

2.4.1. Elevated plus maze test (EPM)

This test based on exploration was conducted under red dim light. Animals were exposed to a non-painted wood, plus-shaped maze, made with four arms (50 × 10 cm) placed on an elevated platform (50 cm from the floor). Opposite arms were surrounded by walls (40 cm high), while the others were kept without protection. Rats were placed in the center of the maze facing an open arm and left to explore during 10 min, under red illumination. Sessions were videotaped and behavior analyzed later by two independent observers to quantify the following variables: time (seconds) spent exploring the center, open or closed arms, and the total number of crossing from the open to closed arms (or vice-versa). A rat is considered to cross to an arm when it puts its four paws in that place. An increased time in the open arms was interpreted as an anxiolytic-like effect, while changes in total number of crossing were considered to reflect variations in locomotor activity (Fernández-Guasti et al., 1999).

2.4.2. Burying behavior test (BBT)

All procedures were conducted under red dim light. Three days before the test, rats were habituated to an experimental cage (27 × 16 × 23 cm) containing 5 cm of fine sawdust during 30 min per day; on the fourth day, the cage was conditioned with an acrylic prod in a wall (2 cm above the bed), which was connected to a stimulator of constant current (model 5806, LaFayette Instruments, Inc., IN, USA). Rats were individually tested during 10 min: when a rat touched the prod it received one or more electric shocks (0.3 mA) and responded to it

expressing burying behavior, which consisted of moving the sawdust with its forepaws until having buried the prod (source of aversive stimulation). All sessions were videotaped and analyzed by two independent observers to quantify a set of parameters: cumulative burying behavior, consisting of the sum of all periods (seconds) the rat lasted to bury the prod; time of immobility, consisting of cumulative time during which rats keep motionless expressed at any moment of the test; latency to burying behavior, defined as the time elapsed since the rat received the first electric shock until it started to bury; and number of electric shocks received by the rat during the test. Treatments reducing cumulative burying or immobility behaviors are considered anxiolytic drugs (Treit et al., 1981). Changes in burying behavior latency may denote variations in time reaction, while an increase in number of shocks may reflect analgesic effects (Rogel-Salazar and López-Rubalcava, 2011).

2.4.3. Forced swimming test (FST)

For the FST we have used a protocol consistent with previous experiments for determination of behavioral despair and effect of antidepressants (Martínez-Mota et al., 2011). Rats were individually placed into a glass cylinder (46 cm height × 20 cm diameter) containing 30 cm of water at 23 ± 2 °C, in two swimming sessions, 24 h apart. The former was considered the pre-test (15-min) while the latter (5-min) was video recorded to later evaluate changes in depressive (i.e., immobility) and motivational (swimming and climbing) behaviors. At the end of each session, animals were taken out, dried with tissue paper and placed in a warm cage to recover (23 ± 2 °C) during 15 min. Two observers blinded to the treatments carried out a time-sampling technique to score, every 5 s: immobility, defined as the minimum movements done by animals to keep their nostril above the water (i.e., floating); swimming, movements implicating displacement in the cylinder; and climbing, movements executed with forepaws in and out the water usually against the cylinder walls (Detke et al., 1995).

2.4.4. Ambulation in the open field test (OFT)

This evaluation was conducted in order to discard confounding drug actions (i.e., increase in locomotor activity) that might affect interpretation of anxiety and depressive test. The rats were evaluated during 5 min in an automatic system (PanLab, Spain) consisting of a plexiglass cage (45 × 35 × 45 cm) with two infrared sensors located on the cage walls (2.5 and 10.5 cm from the cage base), coupled with an IR LE8811 software. The system registered and counted all of the rat's movements.

2.5. Determination of serum levels of E₂ and B

Rats (n = 4–8) were decapitated 30 min after the last behavioral evaluation to obtain trunk blood, considering that B peaks at this time after the FST (Martínez-Mota et al., 2011). Blood was centrifuged (4000 r.p.m. for 25 min at 4 °C) and serum was stored at -20 °C. Total E₂ or B serum concentrations were measured by radioimmunoassay using commercial kits (TKE21 and TKRC1, respectively, from Coat-A-Count, Siemens, Germany) following the manufacturer's instructions. The procedure used antibody-coated tubes in which ¹²⁵I-labeled E₂ or B competed with the sample of label free steroids for antibody sites. After incubation, separation of bound from the unbound E₂ or B was achieved by decanting. The tubes were then counted in a gamma counter; the counts being inversely related to the amount of hormones present in the serum. E₂ (pg/mL) and B (ng/mL), total quantity was determined using a calibration curve counts. The specific activity was 4 μCi. The sensitivity limit for E₂ was 8 pg/mL and for B 5.7 ng/mL. Intra- and inter-assay variations were <7% and <8.1% for E₂ respectively, and <12.2% and <14.9% for B. B values were later converted to μg/dL.

2.6. Experimental design

61 Ovx rats were assigned to independent groups in order to receive one of the following treatments: E₂ 40 μg/kg (n = 12); prolame 60 μg/kg (n = 13); butolame 65 μg/kg (n = 12); pentolame 70 μg/kg (n = 12) or corn oil as vehicle (n = 12). All compounds were chronically administered during a period of 26 days, one s.c. injection per day at 09:00 h, with a total volume of 0.2 mL per rat. Doses of E₂ and prolame were selected on the basis of their antidepressant-like effects reported in a former study (Lemini et al., 2013); doses of butolame and pentolame were chosen considering their equivalence in molar concentration with respect to E₂. Duration of the treatments was chosen on the basis of prolame's psychoactive reported effects (Limón et al., 2012; Nissen et al., 2012).

2.7. General procedure

Rats were evaluated with the previously mentioned behavioral tests from day 24 to 26 of treatment. Experimental sessions were carried out between 10:00 and 14:00 h, starting at day 24 with the EPM and the BBT, separated by 90 min. At day 25, animals were submitted to the pre-FST, while at day 26 animals were subjected to the OFT followed by the 5 min session of the FST.

2.8. Statistical analysis

Behavioral and hormone results were expressed as mean ± standard error (s.e.m.), and initially analyzed with a normality test followed by a one-way ANOVA. Post-hoc tests were applied when ANOVA reached statistical significance (p < 0.05), using the Holm–Sidak method for multiple comparisons, and Student's *t* test for paired data (Zolman, 1993). Sample size was calculated with 80% power. All the statistical analyses were performed with Sigma Stat 3.1 (Copyright© 2004, Systat, Software Inc.).

3. Results

3.1. Effect of the 17β-AEs in the EPM

All estrogens evaluated produced an increase in time spent by rats in the open arms ($F(4,56) = 3.60$, $p = 0.011$, Panel a, Fig. 2); butolame and pentolame reduced the time that rats stayed in the closed arms ($F(4,56) = 3.86$, $p = 0.008$, Panel b), while E₂ and prolame produced only a mild reduction of this parameter, without attaining statistical significance. Treatments did not affect the time that rats stayed in the center of the maze ($F(4,56) = 1.88$, $p = 0.12$, Panel c). Finally, butolame significantly increased the number of total maze crosses, with respect to the vehicle group ($F(4,56) = 2.79$, $p = 0.035$, Panel d).

3.2. Effect of the 17β-AEs in the BBT

In response to electric shock, some animals did not exhibit burying behavior: 6/12 (50%) of the control group, 1/13 (7.6%) of prolame, 1/12 (8.3%) of butolame, and 3/12 (25%) of the pentolame group. ANOVA was carried out with data from animals that expressed burying behavior: pentolame significantly reduced the cumulative burying behavior with respect to the vehicle or E₂ groups ($F(4,45) = 3.50$, $p = 0.014$, Panel b, Fig. 3). However, the presence of either treatment modified other parameters in this paradigm (latency to burying, $F(4,45) = 0.26$, $p = 0.92$, Panel a; time of immobility, $F(4,45) = 0.95$, $p = 0.44$, Panel c; number of received electric shocks, $F(4,45) = 0.32$, $p = 0.86$, Panel d).

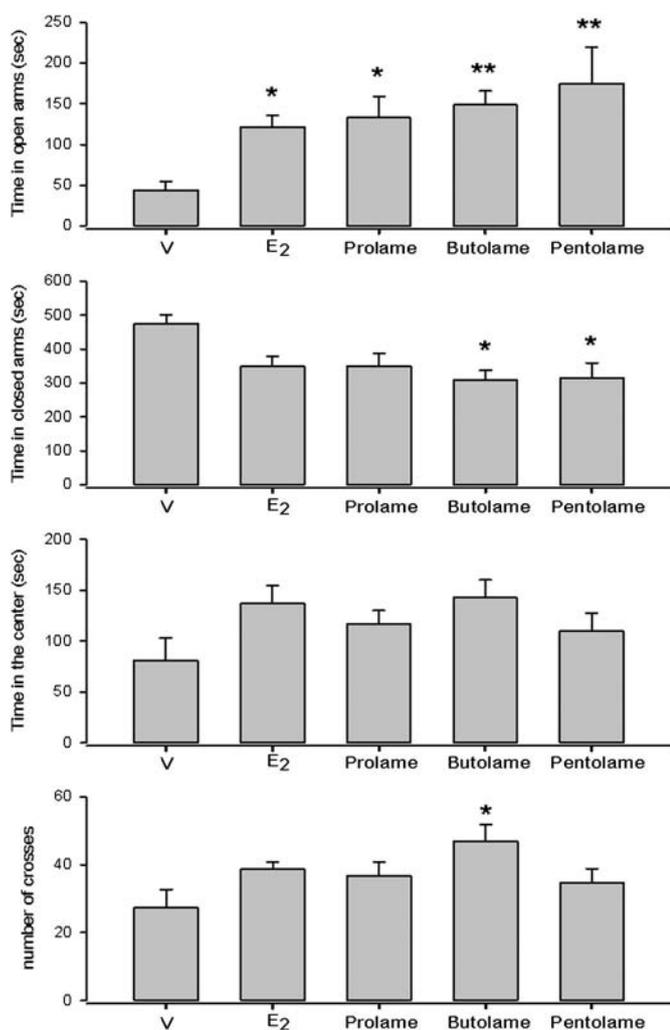


Fig. 2. Effect of 17 β -AEs in OvX female evaluated in EPM. Results of the Holm–Sidak method: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control group chronically treated with vehicle.

3.3. Effect of 17 β -AEs in the FST

Chronic treatments with prolame and E₂ significantly reduced immobility ($F(4,56) = 4.24$, $p = 0.005$, Panel a, Fig. 4) and increased climbing ($F(4,56) = 2.72$, $p = 0.039$, Panel c) without affecting swimming ($F(4,56) = 2.03$, $p = 0.10$, Panel b). The antidepressant effect induced by prolame was not statistically different from the one induced by E₂. Butolame and pentolame only produced a mild reduction in immobility and a modest increase in climbing, without attaining statistical significance.

3.4. Effect of 17 β -AEs in the OFT

In this test, only prolame produced a reduction in the number of counts with respect to E₂ but not with respect to the vehicle group ($F(4,56) = 3.26$, $p = 0.018$, Fig. 5).

3.5. Effect of the 17 β -AEs on the levels of E₂ and B

Serum concentrations of E₂ and B from estrogen and vehicle treated rats ($n = 34$), obtained by radioimmunoassay, are shown in Table 1. E₂ chronic treatment elicited the highest levels of this steroid. Prolame, butolame and pentolame chronic treatment induced E₂ serum levels in the same range as the vehicle control group. On the other hand, any

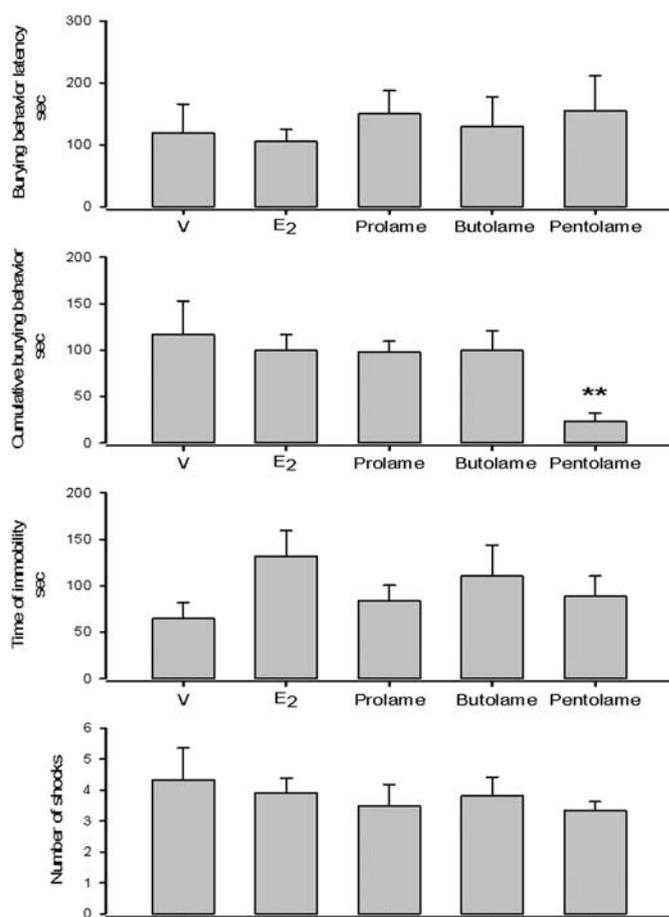


Fig. 3. Effect of 17 β -AEs in OvX female rats evaluated in the BBT. Results of the Holm–Sidak method: ** $p < 0.01$ versus control group chronically treated with vehicle.

treatment significantly modified the serum levels of B with respect to the control.

4. Discussion

4.1. 17 β -AEs anxiolytic effects in the EPM and BBT

Chronic administration of E₂ or the 17 β -AEs prolame, butolame and pentolame increased the time rats spent in the open arms of the EPM, thus they were capable of producing an anxiolytic-like effect. Butolame and pentolame produced effects of greater magnitude and significance; congruently these treatments resulted in a reduction of time spent in the closed arms. All estrogens increased number of crossings in the maze but only butolame enhanced the number of crossings reaching statistical significance. This suggests that the anxiolytic-like effect of E₂ and 17 β -AEs does not depend on increased ambulation. Differences in the pharmacological efficacy of 17 β -AEs in the EPM also are related to changes in exploratory behavior expressed here.

Anxiolysis induced by 17 β -AEs in the EPM was structure-dependent, increasing in magnitude according to the number of methylenes in the amino-alcohol side chain [$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ at C-17] with three, four, or five methylenes ($n = 3$, or 4, or 5, Fig. 1). The order followed was: E₂, +176%; prolame, +201%; butolame, +237%; and pentolame, +295%, with regard to the control group (100%). The activity increasing order reveals that the longer chain associated with butolame and pentolame structures is capable of producing more significant anxiolytic effects, even higher than equimolar doses of E₂.

In the defensive burying behavior paradigm, only pentolame reduced the time the rats spent burying the prod, the main indicator of anxiolytic-like behavior (Treit et al., 1981). Pentolame exhibited a

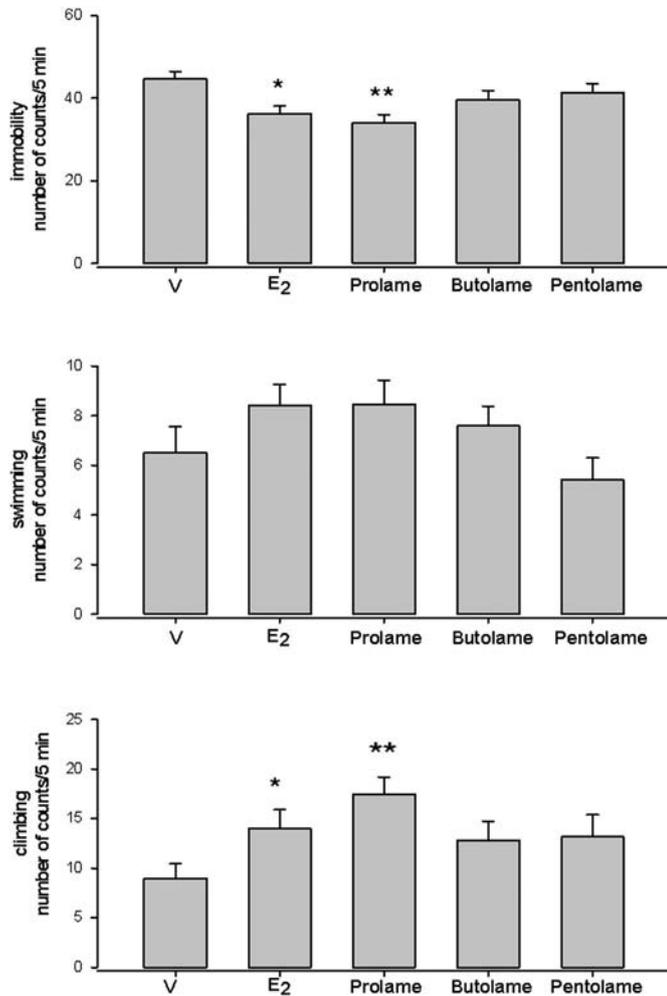


Fig. 4. Effect of 17 β -AEs in OvX female rats subjected to the FST. Results of the Holm–Sidak method: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control group chronically treated with vehicle.

remarkable potency as an anxiolytic without modifying passive expressions of anxiety (immobility), the response threshold to aversive stimulus (measured by changes in burying behavior latency) and sensitivity of the nocive stimulus (number of shocks received by rats). In contrast E₂, prolame and butolame were unable to reduce cumulative burying or immobility behavior. These treatments also did not modify other behaviors considered indicators of a state of anxiety (Rogel-Salazar and López-Rubalcava, 2011), such as grooming to snout or a whole body discontinuous grooming pattern (*data not shown*). Meanwhile in the OFT, prolame reduced ambulation but pentolame and butolame did not alter it, indicating that motor behaviors were not related to the anxiolytic effect of pentolame. Data from the ambulation test also discarded

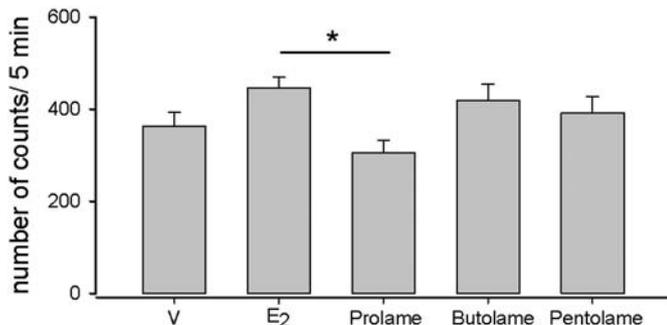


Fig. 5. Effect of 17 β -AEs in OvX female rats evaluated in the OFT. Results of the Holm–Sidak method: * $p < 0.05$, prolame group versus E₂ group.

Table 1

Serum levels of steroids in OvX female rats chronically treated with 17 β -AEs.

Groups	E ₂	B	n
	pg/mL	μ g/dL	
Vehicle	32.20 \pm 8.00	84.00 \pm 14.30	6
E ₂ 40 μ g/kg	1230.48 \pm 330.4***	54.88 \pm 13.49	4
Prolame 60 μ g/kg	45.24 \pm 14.78	64.88 \pm 10.53	9
Butolame 65 μ g/kg	27.38 \pm 16.83	54.16 \pm 13.82	8
Pentolame 70 μ g/kg	24.61 \pm 11.56	85.37 \pm 16.60	7
One-way ANOVA	F (4,29) = 27.20, $p < 0.001$	F (4,29) = 1.17, $p = 0.36$	

Results are expressed as mean \pm s.e.m. Results of the Tukey's test: *** $p < 0.001$ versus the other groups.

unspecific effects of E₂, prolame and butolame that would abrogate their anxiolytic-like activity in the BBT. Altogether, data obtained in the BBT suggests some selectivity of pentolame to modulate anxiety-like behavior.

E₂ was used here as the reference hormone for comparison of butolame and pentolame's effect in both models of experimental anxiety. Contrary to reduction of anxiety induced by chronic treatment within the EPM, we found no effect of this steroid on anxiety-like behaviors in the BBT. This result contrasts with some literature data. For example, female rats in proestrus exhibit less cumulative burying behavior than OvX ones (Fernandez-Guasti and Picazo, 1992). Rats in proestrus have higher levels of estrogens along the estrous cycle, and high levels of estrogens with respect to OvX females. In concordance with physiological regulation of anxiety by estrogens, E₂ treatment produces anxiolytic-like effects in OvX females in the BBT (Walf and Frye, 2005b). The regimen treatment of E₂ used in our study may explain the lack of an anxiolytic-like effect: 26 days of E₂ at 40 μ g/kg versus a single treatment of E₂ at 10 μ g/rat. Taken together these results seem to be in line with literature data regarding that the effect of estrogens in anxiety depends on conditions such as regimen and dosage (Martínez-Mota et al., 2000; Walf and Frye, 2005a,b), and the point of initiation of the treatment with estrogens in females (Walf and Frye, 2009). The lack of effect observed with prolame and butolame in the BBT suggests that the type of estrogen is also a variable to be considered in selection of ERT.

Differences in effects of E₂ or 17 β -AEs in EPM and BBT may be interpreted in relation to different types of anxiety. EPM has been proposed as a model of fear to open spaces (acrophobia) while the BBT has been described as a model of generalized anxiety by a noxious stimulus. In the EPM, anxiety expression is manifested by rodents' preference for dark/closed areas and by avoidance of open spaces, a form of unconditioned fear. Furthermore, expression of anxiety- or anxiolytic-like behavior depends on the rats' activity level (File and Aranko, 1998). The BBT causes conditioned fear responses to the noxious stimulus such as defensive burying, freezing or immobility behaviors (De Boer and Koolhaas, 2003). In agreement with this, all estrogens evaluated in our study may regulate expression of unconditioned forms of anxiety, but pentolame might induce effects on expression of a conditioned form of anxiety.

4.2. Prolame and E₂ antidepressant-like effect in the FST

Chronic administration of prolame and E₂ produced a reduction of immobility behavior in the FST, which is interpreted as an antidepressant-like effect. These results support a previous report about prolame's antidepressant effect elicited by subacute administration in the same animal model (Lemini et al., 2013). Antidepressant-like actions of prolame and E₂ were manifested without producing side effects in locomotor activity, i.e., increased exploration, which accounted for their specific actions on depressive-like behavior in the FST. Actions of prolame in this paradigm and anxiolytic-like effects in EPM (current results, Nissen et al., 2012) give further support to the idea that prolame may impact several affective-like behaviors in hypoestrogenic females.

Reports about the modified version of the FST described active behavior differences which permit to distinguish mechanistic differences involved in the antidepressant activity of drugs. Antidepressants acting on the serotonergic system (i.e., fluoxetine) produce an increase in swimming, whereas those interacting with noradrenergic and/or dopaminergic systems (i.e., reboxetine, desipramine, bupropion) facilitate climbing (Detke et al., 1995). In the current study, chronic administration of prolame (and E_2) increased climbing behavior in concurrence with the decrease of immobility. This suggests participation of catecholamines in their action as antidepressants, a hypothesis that should be tested. However, prolame's actions on the serotonin system cannot be excluded since subacute administration increased swimming in Ovx female rats (Lemini et al., 2013). Other dual actions on these neurotransmitter systems have been reported to antidepressant drugs such as venlafaxine, and estrogens such as ethinylestradiol (Vega-Rivera et al., 2013). Furthermore, reduction of immobility in the FST induced by prolame was blocked by the unspecific estrogen receptor (ER) antagonist tamoxifen, evidencing participation of ERs in this response (Lemini et al., 2013). Then, prolame might have interaction with several targets in the brain to regulate affective-like behaviors.

In contrast to the actions of prolame, butolame and pentolame in chronic (65 or 70 mg/kg, of this study) or subacute (10, 20, 50, 100 and 200 μ g/rat, Lemini et al., 2013) treatment, did not produce antidepressant-like effects in the FST. Apparently the difference of one or two methylenes in the substituent on the amino group chain on C-17 β is critical to manifest the antidepressant-like effect of these compounds. This change also may account for the mechanism of action of these steroids in some cell types. Recent data obtained in an asthma animal model supports this suggestion. 17 β -AEs induced hyper-responsiveness to histamine, carbachol and KCl; following a pattern of pentolame > butolame > aminoestrol (a 17 β -estrogen without the alkyl alcohol substitution on the NH— group). Interestingly pentolame, in greater extent than butolame, enhanced the opening of the L-type voltage dependent Ca^{2+} channels in this model, in opposition to aminoestrol and E_2 (Flores-Soto et al., 2015). This membrane mechanism would, on the one hand play a role in the effects of pentolame and butolame on anxiety, and the other hand, restrict their actions as antidepressants.

4.3. Central effects of 17 β -AEs association with E_2 and B levels

It is proposed that physiological levels of E_2 reached by certain doses of treatments may account for its effects on non-reproductive behaviors, while infra- or supra-physiological levels might evoke deleterious effects (Barha et al., 2012; Martínez-Mota et al., 2008; Walf and Frye, 2005a). Here we found that chronic treatment with 17 β -AEs did not produce higher E_2 serum levels; instead, these levels were similar to those detected in control animals. The pharmacokinetic of 17 β -AEs has not been studied so far. However, current findings suggest that 17 β -AEs tested here are not biotransformed to E_2 and possess psychoactive properties by themselves. On the other hand, chronic treatment with E_2 induced supra-physiological serum levels of the same hormone, which were concordant with its prolonged administration (26 days). The results obtained reveal that for induction of behavioral effects of 17 β -AEs in the paradigms here included, a substantial increase in the serum levels of E_2 is not required.

The levels of serum B detected in vehicle-treated rats suggested an impact of exposure to different tests on the HPA axis. Findings agree with previous reports (File et al., 1994; Martínez-Mota et al., 2011) using the same paradigms in rats. Additionally, 17 β -AEs used as treatments were unable to reduce B levels, however, these treatments favorably impacted behavior, stimulating anxiolytic and/or antidepressant-like effects similar to E_2 . Present results show that effects of 17 β -AEs and E_2 on affective behaviors do not occur following the same pattern of effects on B levels. Notwithstanding, literature data does not allow to discard the interaction between estrogens and the HPA axis, since these hormones incide on other points beyond adrenal glands, i.e.,

hypothalamus or even hippocampus (Kudielka et al., 1999; Weiser and Handa, 2009). Consequently, regulation of affective states by estrogens is complex and the scope of this work was limited to identify effects of 17 β -AEs on behavior.

4.4. Structure-activity relationship in effect of 17 β -AEs

It is remarkable that current results for 17 β -AEs in regulation of behavior are in an inverse relationship to that found with the same compounds on their reproductive actions. The structural change in the C17 β steroid molecule by inserting an amino group decreases the estrogenic activity of 17 β -AEs (Jaimez et al., 2000; Lemus et al., 1998). In the series prolame, butolame, and pentolame, the lengthening of the chain substitution on the amino group diminishes potency related to E_2 . These estrogens increase dose effective 50 (DE50) and inhibit LH, exert uterotrophic effects, and stimulate female sexual behavior and the binding to ERs (Jaimez et al., 2000; Lemini and Canchola, 2009; Lemini et al., 2005b; Lemus et al., 1998). Pentolame, with five methylene insertion at the 17 β amino-alcohol side-chain, possessed the weakest estrogenic properties and showed the lowest efficacy and potency with respect to the other 17 β -AEs in induction of reproductive effects. Particularly in the lordotic behavior, it showed remarkable differences with respect to E_2 (ED50 pentolame 1037 μ g/kg versus E_2 10 μ g/kg). Here we demonstrate pentolame's actions specifically for anxiety, at least in the EPM and BBT. Thus, actions of pentolame are more selective for anxiety, while prolame has strong antidepressant activity. Then, psychoactive properties of the 17 β -AEs are strongly influenced by the structural changes of these molecules.

4.5. Possible mechanisms of action of 17 β -AEs on behavior

Data points out that prolame and E_2 may produce their effects by interaction with ERs (Lemini et al., 2013). Prolame and E_2 have equivalent affinity for both ER α and ER β subtypes (Jaimez et al., 2000; Lemus et al., 1998) and structurally are closer. Cytosolic ERs belong to the nuclear receptor superfamily; they are considered ligand-regulated transcription factors which participate in regulation of genes involved emotion and behavior, i. e., brain derived neurotrophic factor (Osterlund et al., 2005; Suzuki et al., 2013). Possibly E_2 and prolame share this mechanism of action. Meanwhile, butolame and pentolame show specific anxiolytic-like effects. Structurally these hormones are similar; this feature confer more affinity for ER α , mainly for pentolame (Jaimez et al., 2000; Lemus et al., 1998). This mechanism may add to membrane action induced by these steroids (Flores-Soto et al., 2015).

5. Conclusion

The present study shows first evidence that butolame and pentolame, under chronic administration, produce anxiolytic-like effects in Ovx rats of greater selectivity. Results also confirm the broader potential of prolame as a psychoactive steroid, with important antidepressant actions equiparable in efficacy to E_2 . Taken together, these data give evidence of the potential of 17 β -AEs as ERT, equivalent to E_2 in the regulation of affective behaviors, but without procoagulant actions. Differences in regulation of affective-like behaviors suggest collectively complex mechanisms of action for these synthetic estrogens, possibly linked to their structure.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mr. Sergio Márquez-Baltazar for animal care, Dr. Jaime Herrera-Pérez for technical assistance, Biol. María Estela Avila and Dr. Mónica Cruz-Lemini for careful English language editing. This work was supported by the grants from the PAPIIT UNAM (IN218815), NC143370.1 from the Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" and Fundación Miguel Alemán.

References

- Barha, C.K., Dalton, G.L., Galea, L.A., 2012. Low doses of 17 α -estradiol and 17 β -estradiol facilitate, whereas higher doses of estrone and 17 α - and 17 β -estradiol impair, contextual fear conditioning in adult female rats. *Neuropsychopharmacology* 35, 47–59.
- De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 145–161.
- Detke, M.J., Rickels, M., Lucki, I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differently produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology* 21, 66–72.
- Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., López-Rubalcava, C., 2003. Different estrogenic compounds produce an antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 28, 830–838.
- Estrada-Camarena, E., López-Rubalcava, C., Vega-Rivera, N., Récamier-Carballo, S., Fernández-Guasti, A., 2010. Antidepressant effects of estrogens: a basic approximation. *Behav. Pharmacol.* 21 (5–6), 451–464.
- Farquhar, C., Marjoribanks, J., Lethaby, A., Suckling, J.A., Lamberts, Q., 2009. Long term therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst. Rev.* 15 (CD004143).
- Fernandez-G, J.M., Rubio-Arroyo, M.F., Soriano-García, M., Toscano, R.A., Pérez-César, M., 1985. Synthesis and molecular structure of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine; an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids* 45, 151–155.
- Fernandez-Guasti, A., Picazo, O., 1992. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* 17, 681–689.
- Fernández-Guasti, A., Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., Contreras, C.M., López-Rubalcava, C., 1999. Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle dependent anxiolytic action in the burying behavior but not in the plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63 (1), 13–20.
- File, S.E., Aranko, K., 1998. Sodium valproate and chlordiazepoxide in the elevated plus-maze test of anxiety in the rat. *Neuropsychobiology* 20, 82–86.
- File, S.E., Zangrossi Jr., H., Sanders, F.L., Mabbutt, P.S., 1994. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus maze. *Psychopharmacology* 113 (3–4), 543–546.
- Flores-Soto, E., Martínez-Villa, I., Solís-Chagoyán, H., Sommer, B., Lemini, C., Montaña, L.M., 2015. 17 β -Aminoestrogens induce guinea pig airway smooth muscle hyperresponsiveness through L-type Ca²⁺ channels activation. *Steroids* 101, 64–70.
- Hiroi, R., McDevitt, R.A., Morcos, P.A., Clark, M.S., Neumaier, J.F., 2011. Overexpression or knockdown of rat tryptophan hydroxylase-2 has opposing effects on anxiety behavior in an estrogen-dependent manner. *Neuroscience* 176, 120–131.
- Jaimez, R., Coney, A., Jackson, K., Lemus, A.E., Lemini, C., Cárdenas, M., García, R., Silva, G., Larrea, F., 2000. In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17 β -aminoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 73, 59–66.
- Kalandakanond-Thongsong, S., Daendee, S., Srikiatkachorn, A., 2012. Effect of the acute and chronic estrogen on anxiety in the elevated T-maze. *Physiol. Behav.* 105 (2), 357–363.
- Koss, W.A., Gehlert, D.R., Shekhar, A., 2004. Different effects of subchronic doses of 17 β -estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats. *Horm. Behav.* 46 (2), 158–164.
- Kudielka, B.M., Schmidt-Reinwald, A.K., Hellhammer, D.H., Kirschbaum, C., 1999. Psychological and endocrine responses to psychosocial stress and dexamethasone/corticotrophin-releasing hormone in healthy postmenopausal women and young controls: the impact age and a two-week estradiol treatment. *Neuroendocrinology* 70, 422–430.
- Lemini, C., Canchola, E., 2009. Effects of 17 β -aminoestrogens on the sexual behavior of female rats. *Physiol. Behav.* 96, 662–666.
- Lemini, C., Franco, Y., Avila, M.E., Jaimez, R., 2005a. Contrasting effects of estradiol and 17 β -aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.* 510, 229–233.
- Lemini, C., Franco, Y., Avila, M.E., Jaimez, R., 2005b. Estrogenic effects of and analogous effects of 17 β -aminoestrogens on uteri of rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.* 510, 235–239.
- Lemini, C., Cruz-López, B., Martínez-Mota, L., 2013. Participation of estrogen receptors in the antidepressant-like of prolame in the forced swimming test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 259–266.
- Lemus, A.E., Jaimez, R., Lemini, C., Menjívar, M., Silva, G., Rubio-Poo, C., Valenzuela, F., Larrea, F., 1998. Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen 17 beta-(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame). *Steroids* 63, 433–438.
- Limón, D., Díaz, A., Hernández, M., Fernandez-G, J.M., Torres-Martínez, A.C., Pérez-Severiano, F., Rendón-Huerta, E.P., Montaña, L.F., Guevara, J., 2012. Neuroprotective effects of the aminoestrogen prolame against impairment of learning and memory skills in rats injected with amyloid- β -25–35 into hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 685, 74–80.
- Llaneza, P., García-Portilla, M.P., Llana-Suárez, D., Armott, B., Pérez-López, F.R., 2012. Depressive disorders and the menopause transition. *Maturitas* 71, 120–130.
- Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., López-Rubalcava, C., Contreras, C.M., Fernández-Guasti, A., 2000. Interaction of desipramine with steroid hormones in the burying behavior. *Psychoneuroendocrinology* 25, 109–120.
- Martínez-Mota, L., Cruz-Martínez, J.J., Márquez-Baltazar, M.S., Fernández-Guasti, A., 2008. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88, 332–340.
- Martínez-Mota, L., Ulloa, R.E., Herrera-Pérez, J., Chavira, R., Fernández-Guasti, A., 2011. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiol. Behav.* 104 (5), 900–905.
- Morgan, M.L., Cook, I.A., Rapkin, A.J., 2005. Estrogen augmentation of antidepressant in perimenopausal depression: a pilot study. *J. Clin. Psychiat.* 66 (6), 774–780.
- Narod, S.A., 2011. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 669–676.
- National Research Council (US), 2011. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. National Academies Press, Washington (DC).
- Nissen, I., Estrada, F.S., Nava-Kopp, A.T., Irls, C., de la Peña-Díaz, A., Fernández-G, J.M., Goyezensky, T., Zhang, L., 2012. Prolame ameliorates anxiety and spatial learning and memory impairment induced by ovariectomy in rats. *Physiol. Behav.* 106, 278–284.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación.*
- Osterlund, M.K., Witt, M.R., Gustafsson, J.A., 2005. Estrogen action in mood and neurodegenerative disorders: estrogenic compounds with selective properties – the next generation of therapeutics. *Endocrine* 28, 235–242.
- Pattacchioli, F.R., Simeoni, S., Monnazzi, P., Pace, M., Capri, O., Perrone, G., 2006. Menopause, mild psychological stress and salivary cortisol: influence of long-term hormone replacement (HRT). *Maturitas* 55, 150–155.
- Rasgon, N.L., Altschuler, L.L., Fairbanks, L.A., Dunkin, J.J., Davtvan, C., Elman, S., Rapkin, A.J., 2002. Estrogen replacement therapy in the treatment of major depressive disorder in perimenopausal women. *J. Clin. Psychiatry* 63, 45–48.
- Rogel-Salazar, G., López-Rubalcava, C., 2011. Evaluation of anxiolytic-like effects of clomipramine in two rat strain with different anxiety vulnerability (Wistar and Wistar-Kyoto rats): participation of 5-HT_{1A} receptors. *Behav. Pharmacol.* 22, 136–146.
- Soares, C.N., Almeida, O.P., Joffe, H., Cohen, L.S., 2001. Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 529–534.
- Suzuki, H., Barros, R.P., Sugiyama, N., Krishnan, V., Yaden, B.C., Kim, H.J., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2013. Involvement of estrogen receptor β in maintenance of serotonergic neurons of the dorsal raphe. *Mol. Psychiatry* 18, 674–680.
- Terauchi, M., Hiramitsu, S., Akiyoshi, M., Owa, Y., Kato, K., Obayashi, S., Matsushima, E., Kubota, T., 2013. Association among depression, anxiety and somatic symptoms in peri- and postmenopausal women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 39, 1007–1013.
- Treit, D., Pinel, J.P., Fibiger, H.C., 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 619–626.
- Vega-Rivera, N.M., López-Rubalcava, C., Estrada-Camarena, E., 2013. The antidepressant-like effect of ethynyl estradiol is mediated by both serotonergic and noradrenergic systems in the forced swimming test. *Neuroscience* 250, 102–111.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2005a. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regime may be modulated by hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology* 30, 1288–1301.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2005b. ER β -selective estrogen receptors modulators produce anti-anxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 1598–1609.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2009. Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. *Gend. Med.* 6, 300–311.
- Weiser, M.J., Handa, R.J., 2009. Estrogens impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via estrogen receptor alpha within hypothalamus. *Neuroscience* 159, 883–895.
- Zolman, J.F., 1993. *Biostatistics Experimental Design and Statistical Inference*. Oxford University Press, New York, p. 131.