



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

“Inhibición de la citotoxicidad producida por el valerato de estradiol sobre neuronas β -endorfinérgicas a través de un inhibidor de aromatasa y su relación con el consumo de etanol en la rata”

Tesis
que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIA DEL COMPORTAMIENTO
(OPCIÓN NEUROCIENCIA)

presenta

Lucía Valenzuela Salazar

Comité tutorial

Dr. Jorge Juárez González (Director)

Dr. Alfredo Feria Velasco

Dra. Julieta Ramos Loyo

Guadalajara, Jalisco

Julio de 2010

AGRADECIMIENTOS

A la universidad de Guadalajara y al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco A. C. por brindarme un espacio donde realizar mi formación profesional.

Al Dr. Jorge Juárez, quien como director del presente proyecto, me transmitió un caudal de conocimientos y experiencias, me otorgó su paciencia, confianza y amistad, mostrándome que los grados académicos no se pelean con la humildad.

A la Dra. Julieta Ramos quien me acompañó en todo momento durante esta meta.

Al Dr. Alfredo Feria, por sus valiosas aportaciones y asesorías oportunas como miembro del comité tutelar.

Al Dr. Ulises Gómez, quien fue un gran maestro y asesor, enseñándome de manera constante los valores de la responsabilidad, confianza y sencillez.

Al Dr. Alejandro Canales quien nos brindó su apoyo abriéndonos las puertas de su laboratorio de la mejor manera.

A mis pequeñas ratas, que apoyaron con su vida la realización del trabajo.

A mi amado esposo quien me da día a día la fuerza para seguir adelante, te amo Juan Antonio Cao Romero Pino.

A mi príncipe fiel e incondicional amigo, mi perro Sancho.

A cualquier persona que lea esta tesis, esperando le sea de utilidad.

Gracias

RESUMEN:

La aplicación de Valerato de Estradiol (VE) (2mg) a ratas hembras adultas jóvenes, que ciclan regularmente, propicia un fenómeno citotóxico en el Núcleo Arcuato Hipotalámico (NAH), que es específica para neuronas β -endorfinicas (β -end). Es ampliamente conocido que la deficiencia de este péptido se relaciona con dependencia al alcohol, y en este modelo experimental los sujetos incrementan el consumo en la quinta semana post-VE. El mecanismo subyacente a este proceso de citotoxicidad aún no ha sido esclarecido y se postula que los estrógenos endógenos producidos por los ovarios poliquísticos lo median, ya que ratas ovariectomizadas no exhiben esta lesión hipotalámica. Elegimos estudiar la participación de dicho esteroide gonadal en la muerte de neuronas inmunoreactivas β -end y en el consumo de alcohol empleando la siguiente estrategia metodológica: 2 grupos de ratas hembras Wistar adultas intactas, que fueron expuestas al consumo voluntario de alcohol, y tras establecer el nivel basal de consumo les fue administrado 2mg de VE/dosis única. Tras 21 días de esta manipulación, y sin interrumpir el consumo de alcohol, un grupo recibió s.c. 375 μ g/kg/día/11 semanas del inhibidor de aromatasas Letrozol (LTZ), y el segundo grupo recibió el vehículo (VH) correspondiente en el mismo periodo de 11 semanas. Encontramos que la dosis crónica de VE desencadenó estro permanente, decrementó el consumo de alimento tras 1 semana de su administración, y con ello una pausa en la ganancia de peso corporal, redujo drásticamente la población de neuronas β -end en el grupo VE +V H e incrementó significativamente el consumo de alcohol en la semana 5 post-VE. Por su parte el inhibidor de la biosíntesis estrogénica LTZ protegió totalmente la población de neuronas β -end del NAH, sin afectar el consumo de alcohol significativamente aunque con tendencia a ser menor que el grupo VE+VH e incrementó el peso corporal en las semanas 7, 8, 9 y 11 post-LTZ lo cual se atribuye a la privación farmacológica estrogénica. A partir de los presentes hallazgos concluimos que la estrategia metodológica elegida apoya el incremento en el consumo de alcohol en la quinta semana post-VE, que se reduce significativamente la población de neuronas β -end con la aplicación de VE (2mg), y que la dosis empleada del inhibidor de la enzima aromatasas no afecta el consumo de etanol, pero protege en su totalidad a estas neuronas peptidérgicas. Consideramos que este estudio esclarece el papel de los

estrógenos endógenos sobre la citotoxicidad en neuronas secretoras de proopiomelanocortina (POMC) del NAH.

ABSTRACT

Administration of a single dose of Estradiol Valerate (EV), (2mg) to intact mature female rats with regular estral cycles, causes a specific cytotoxicity in secretory neurons of β -endorphin (β -end) of the Hypothalamic Arcuate Nucleus (HAN). On the other hand, it has been described that deficiency of this peptide is related to alcohol dependence in humans, and in the experimental model of β -endorphinergic neuronal deficiency by EV in rats the alcohol consumption is increased. The mechanism underlying the β -end cytotoxicity process has not been clarified yet, and it is postulated that endogenous estrogens produced by polycystic ovaries are mediators of the cell death, since ovariectomized rats do not exhibit this hypothalamic lesion. With the aim to study the estrogen participation in the death of β -end neurons, and its repercussion in the alcohol consumption the following methodological design was used: 2 groups of intact mature Wistar female rats were exposed to free-choice alcohol intake, and after assessing the basal levels (BL) of the consumption, each female was treated with 2mg of a single dose of EV, 2mg/rat. After 21 days of EV injection, one group received s.c. 375 μ g/kg/day/11 weeks of the aromatase inhibitor letrozole (LTZ) and the second group received the vehicle (VH). Both treatments were conducted during 11 weeks. Alcohol was available every other day from the base line to the final of the study. We found that chronic doses of EV: triggered persistent estrus; decreased food intake in the first week after administration (and thereby a break in gain body weight); reduced dramatically the population of β -end neurons in the group EV+VH; and increased significantly the alcohol consumption in week 5 post-EV, regardless of group. The inhibitor of estrogen biosynthesis LTZ fully protected population of β -end neurons in HAN, without affecting significantly alcohol consumption, although a tendency to be lower than the group EV+VH was observed. Body weight was increased at weeks 7, 8, 9 and 11 post-LTZ which could be attributed to pharmacological deprivation of estrogens. From the present findings we concluded that the increase in alcohol consumption around the fifth week post-EV is not apparently related with β -end neuronal deficit; EV significantly reduced population of β -end neurons, and that the

dose used of aromatase-inhibitor enzyme does not affect ethanol consumption, but fully protects to these peptidergic neurons, which support the role of endogenous estrogens on cytotoxicity in the proopiomelanocortin (POMC) neurons of the HAN.

RESUMEN		I	
ABSTRACT		II	
ÍNDICE		III	
ABREVIATURAS		V	
I. INTRODUCCIÓN		1	
II. MARCO TEÓRICO		3	
.1 DEFINICIÓN DE ALCOHOLISMO		3	
.2 FENÓMENOS NEUROADAPTATIVOS:		5	
TOLERANCIA Y ABSTINENCIA		5	
2.3 METABOLISMO DEL ETANOL		6	
2.4 FARMACOLOGÍA DEL ALCOHOL		7	
2.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ETANOL		9	
2.6 SISTEMA OPIOIDE		12	
2.7 OPIOIDES Y ALCOHOL		14	
2.8 SISTEMA ENDOCRINO		2	0
2.8.1 CLASIFICACIÓN		21	
2.8.2 SÍNTESIS Y SECRECIÓN HORMONAL	22		
2.8.3 RECEPTORES HORMONALES		23	
2.8.4 ESTEROIDES SEXUALES		23	
2.8.5 ESTRÓGENOS		24	
2.8.6 RECEPTORES DE ESTROGÉNOS		26	
2.9 INHIBIDORES DE AROMATASA		27	
2.10 CICLOS ENDOCRINOS		32	
2.11 CICLO ESTRAL DE LA RATA		32	
2.12 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS		33	
2.13 VALERATO DE ESTRADIOL (VE) Y EFECTOS SOBRE EL HIPOTALÁMO			35
2.14 CIRCUITO NEURONAL AFECTADO POR EL VALERATO DE ESTRADIOL			
40	2.15 MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ESTRADIOL		
42	2.16 SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS COMO MECANISMO MEDIADOR EN EL PROCESO DE C I T O T O X I C I D A D P O R V E		
43	2.17 RELACIÓN ENTRE EL DECREMENTO CENTRAL		

DE B-ENDORFINAS CAUSADO POR EL VE Y		
CONSUMO	DE	ALCOHOL
47		
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA		54
IV. OBJETIVOS		56
V. HIPÓTESIS		57
VI. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS		
58	6.1	VARIABLES
INDEPENDIENTES		58
6.2 VARIABLES DEPENDIENTES		58
6.3 SUJETOS		59
6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL		5 9
6.5 CONDICIONES DE LABORATORIO		60
6.6 INDUCCIÓN AL ALCOHOL		
60	6.7 LÍNEA BASE	
60		
6.6.8 ASIGNACIÓN DE LOS SUJETOS A LOS GRUPOS		60
6.9 PESO, AGUA Y ALIMENTO		60
6.10 TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS		60
6.11 TRATAMIENTO CON LETROZOL		61
6.12 CITOLOGÍA VAGINAL		61
6.13		PERFUSIÓN
61	6.14	CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS
INMUNORREACTIVAS		A B-ENDORFINAS (B-END)
		61
6.15 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA B-ENDORFINAS		62
6.16 CONSIDERACIONES ÉTICAS		62
VII. RESULTADOS		63
VIII. DISCUSIÓN		71
IX. CONCLUSIONES		77
X. REFERENCIAS		78
XI. ANEXOS		93

ABREVIATURAS

VE	Valerato de estradiol
NAH	Núcleo Arcuato Hipotalámico
LB	Línea Base
VH	Vehículo
E2	Estradiol
T	Testosterona
POMC	Proiomelanocortina
CCK	Colecistocinina
H-H-G	Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas
Post-VE	Posterior al Valerato de Estradiol
ADH	Alcohol deshidrogenasa
NAD	Nicotinamida-Adenosina-Dinucleótido
NADH	Aldehído Deshidrogenasa Hepática
MEOS	Sistema Microsomal de Oxidación del etanol
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
NMDA	N-Metil D-Aspartato
SNC	Sistema Nervioso Central
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
TH	Tirosina Hidroxilasa
ATV	Área Tegmental Ventral
NA	Núcleo Accumbens
β-end	β-endorfinas
P	Preferentes
NP	No Preferentes

RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensajero
RNA_t	Ácido Ribonucleico de transferencia
TSH	Hormona Estimulante del Tiroides
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
TSH	Hormona Estimulante del Tiroides
FSH	hormona foliculoestimulante
LH	hormona luteinizante
ADH	hormona antidiurética o vasopresina
TRF	Factor Liberador de Tirotropina
LHRH	Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
Ip3	Trifosfato de Inositol
DAG	Diacilglicerol
CMPC	Guanosin Monofosfato Cíclico
RE	Receptor Estrogénico
SHBG	Globulina Fijadora de Hormona Sexual
GnRH	Factor Liberador de Gonadotropinas
TMX	Tamoxifen
i.p.	Intraperitoneal
s.c.	Subcutánea
i.m.	Intramuscular
mg	Miligramo
min	Minuto
M	Molar
kg	Kilogramo
IgG	Inmunoglobulina G
ATZ	Anastrozol
FDZ	Fadrozol
APM	Área Preóptica Medial
OP	Ovarios Poliquísticos
RIA	Radioinmunoanálisis

NPY	Neuropéptido Y
DAB	Diaminobenzidina
SOP	Síndrome de Ovarios poliquísticos
NA	Norepinefrina
mosm	Miliosmol
nm	Nanómetro

I. INTRODUCCIÓN

El papel de las hormonas gonadales en el control del consumo voluntario de alcohol ha sido considerado en pocos estudios. Diversas investigaciones experimentales han mostrado que los estrógenos pueden influir sobre el consumo de alcohol, y que su administración desencadena alteraciones en muchos sistemas de neurotransmisión implicados en el consumo de dicha droga, incluyendo el sistema opioide. Uno de los medios a través de los cuales los estrógenos pueden afectar el consumo del alcohol es a través de su interacción con el sistema de proopiomelanocortina (POMC) hipotalámico, el cual involucra la síntesis de β -endorfinas.

Se ha reportado que al aplicar una sola dosis de Valerato de Estradiol (VE) (2mg) a ratas hembras con ovarios intactos, ocurre un fenómeno de citotoxicidad en el núcleo arqueado hipotalámico (NAH), observándose reducción en el número de neuronas secretoras de β -endorfinas (β -end) y por consiguiente de este péptido 60 días después de su administración. La dependencia al alcohol se ha relacionado con una deficiencia de β -end y se ha observado que en este modelo de citotoxicidad los sujetos incrementan los consumos de alcohol.

Dado que el apetito incrementado por bebidas alcohólicas es una variable importante para el abuso del alcohol y el alcoholismo, el hallazgo de que una hormona puede incrementar el consumo del alcohol es particularmente interesante. Esto adquiere mayor relevancia si atendemos al hecho de que los compuestos que inducen actividad estrogénica continua son ampliamente usados como medicamentos por las mujeres.

El mecanismo a través del cual el VE es capaz de desencadenar la reducción en neuronas β -endofinéricas del núcleo arcuato hipotalámico es desconocido, y dado que esta situación no ocurre cuando las ratas son ovariectomizadas, se especula que los estrógenos endógenos producidos por los ovarios poliquísticos son los responsables de dicha citotoxicidad, sin embargo hasta donde sabemos no hay estudios que analicen su participación directa.

Con base en lo anterior, el presente estudio analiza la participación de dichos esteroides, en el efecto que produce el VE sobre el consumo del alcohol y sobre el número de neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arqueado hipotalámico, a través de la inhibición de la biosíntesis estrogénica empleando un inhibidor de aromatasa.

En el presente trabajo se muestran de forma profunda en el marco teórico, temas relacionados con el consumo y dependencia del etanol; se desarrolla ampliamente la descripción del sistema opioide y su relación con el consumo de dicha droga; posteriormente se aborda el sistema hormonal, enfatizando la participación de los estrógenos en el eje neuroendocrino; también se presentan diversos estudios sobre la enzima aromatasa y los fármacos empleados para su inhibición; y en la parte final de la revisión teórica, se abordan las posibles explicaciones e hipótesis propuestas, a cerca de los mecanismos mediadores de la citotoxicidad, que desencadena el VE sobre neuronas peptidérgicas del NAH.

Posteriormente se plantea el problema que se pretende resolver, los objetivos y las hipótesis generados del estudio; se incluye un apartado que describe detalladamente las técnicas y manipulaciones experimentales; hacia el final del documento se presentan gráficamente nuestros hallazgos y conclusiones.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. DEFINICIÓN DE ALCOHOLISMO

El alcoholismo es una enfermedad crónica progresiva que puede ser fatal, y que incluye, dependencia física hacia el alcohol pero también se encuentran asociados factores genéticos, psicológicos y sociales. Particularmente el alcoholismo es un padecimiento multifactorial. Un gran porcentaje de la mortalidad anual es consecuencia de factores desencadenados por el consumo de etanol (Brismar y Bergman, 1998).

En la actualidad el alcoholismo ha sido aceptado como una enfermedad compleja, de difícil tratamiento, asociada a múltiples consecuencias, la Organización Mundial de la Salud la define como la ingesta diaria de alcohol superior a 50 gramos en la mujer y 70 gramos en el hombre. La conducta adictiva asociada con alcoholismo se caracteriza por una preocupación compulsiva por obtener alcohol, pérdida de control sobre el consumo y desarrollo de tolerancia y dependencia, así como con un deteriorado funcionamiento social y ocupacional. Como sucede con otros desórdenes adictivos, el alcoholismo se distingue por una vulnerabilidad crónica a recaídas después de que ha cesado el consumo.

Para entender los factores que llevan a ciertos individuos a beber excesivamente, la investigación sobre alcoholismo se ha centrado en identificar los mecanismos cerebrales que apoyan las acciones reforzantes del alcohol y la progresión de cambios en la función neural, inducidos por el consumo crónico de etanol que permite desarrollar la dependencia (Friedbert y Linda, 2002). También emplean sustancias que bloquean estos efectos, las cuales son denominadas antagonistas opioides. El objetivo principal de estas líneas de investigación es ayudar a reducir el consumo del alcohol, conociendo los mecanismos a través de los cuales esta droga produce la adicción.

Los efectos farmacológicos del etanol que dan soporte al reforzamiento del alcohol y a la conducta de búsqueda involucran acciones sobre múltiples sistemas neuroquímicos y receptores que ocurren en extensos sitios neuroanatómicos a través del cerebro. Juntos todos estos factores, representan una oportunidad única para comprender las bases del uso y abuso del alcohol.

También emplean sustancias que bloquean estos efectos, las cuales son denominadas antagonistas opioides. El objetivo principal de estas líneas de investigación es ayudar a reducir el consumo del alcohol, conociendo los mecanismos a través de los cuales esta droga produce la adicción.

Hay dos tipos de dependencia en esta adicción: la física y la psicológica. La dependencia física se revela por sí misma, cuando se interrumpe la ingesta de alcohol, con síntomas muy claros como la tolerancia al alcohol, cada vez mayor, y enfermedades asociadas a su consumo.

El efecto temprano de tipo estimulante se debe a la depresión de la inhibición cerebral, mientras que los efectos tardíos son el resultado de una depresión más generalizada de otras funciones. El alcohol afecta los reflejos simples y complejos, las reacciones de asociación libre, y la coordinación motora. Todos los aspectos del desarrollo motor se ven perjudicados por el alcohol; el movimiento no es sólo más lento sino también errático e impreciso. De manera similar, el alcohol disminuye la eficiencia de la función mental, del proceso de aprendizaje y la memoria, disminuye la atención y la concentración y trastorna el juicio y la capacidad de razonar en forma clara. Dichas alteraciones neurológicas pueden ser causadas por una combinación de efectos neurotóxicos del etanol o sus metabolitos, factores nutricionales y predisposición genética.

El alcohol también afecta a otros sistemas corporales. Puede aparecer una irritación del tracto gastrointestinal con erosiones en las paredes del estómago debidas a las náuseas y vómitos. Las vitaminas no se absorben bien, y esto ocasiona deficiencias nutricionales en los alcohólicos de larga evolución. También ocasiona problemas en el hígado (cirrosis hepática). El sistema cardiovascular se ve afectado por cardiopatías.

También puede aparecer una alteración sexual causando una disfunción en la erección del pene en el hombre y una desaparición de la menstruación en la mujer. El consumo de alcohol durante el embarazo puede causar problemas en el desarrollo del feto, produciendo el llamado síndrome fetal del alcohol.

Entre los factores psicológicos se incluyen: depresión, a necesidad de consuelo para la ansiedad, conflictos en las relaciones personales, baja estima personal, etc. Los factores sociales incluyen: la facilidad de consumo de alcohol, la aceptación social del consumo de alcohol, estilos de vida de stress, etc.

2.2. FENÓMENOS NEUROADAPTATIVOS: TOLERANCIA Y ABSTINENCIA

Ambos ocurren con exposiciones repetidas a determinadas sustancias, sean éstas adictivas o no. Ambos fenómenos pueden aparecer conjuntamente, lo que sugiere que probablemente comparten algunos de sus mecanismos.

Tolerancia: la administración repetida de etanol produce una disminución en la intensidad de sus efectos, conocida como tolerancia, Tolerancia es, por tanto, pérdida de potencia en la intensidad de un efecto, intensidad que puede ser obtenida habitualmente mediante un incremento de la dosis. A dosis altas, el etanol da lugar a la inducción enzimática del sistema oxidativo microsomal, encargado de la propia metabolización del etanol. Esto ocasiona que a igualdad de ingesta, las alcoholemias sean menores. Es lo que se conoce como tolerancia farmacocinética.

Síndrome de abstinencia: el síndrome de abstinencia alcohólico es un fenómeno complejo que ocurre a diversos niveles cerebrales, este síndrome refleja, en parte, las consecuencias de los cambios celulares responsables de la tolerancia alcohólica. En líneas generales, se caracteriza por un aumento de la actividad simpática en gran parte mediado por la hiperactividad del locus coeruleus, manifestaciones de esta hiperactividad simpática son, entre otros síntomas, la taquicardia, la hipertensión, la sudoración y el temblor (Altman, Everitt, Glautier, Markou, Nutt, Oretti, Philips y

Robbins, 1996).

2.3 METABOLISMO DEL ETANOL

(fig. 1 estructura molecular del etanol)

El metabolismo es el proceso corporal que convierte las sustancias ingeridas en otros compuestos. El metabolismo tiene que ver con un número de procesos, uno de los cuales es conocido como la oxidación. A través de la oxidación en el hígado, el alcohol se desintoxica y se elimina de la sangre, evitando así que el alcohol acumule y destruya las células y los órganos. Una cantidad muy pequeña de alcohol evita el metabolismo y se elimina, sin cambios, en el aliento, en el sudor y en la orina. Hasta que todo el alcohol consumido haya sido metabolizado, se distribuye por todo el cuerpo, teniendo efecto sobre el cerebro y otros tejidos. El hígado es el órgano que metaboliza la mayor cantidad de etanol. Para ello posee tres sistemas enzimáticos que oxidan el etanol:

El complejo enzimático de las alcohol deshidrogenasas (ADH). En las situaciones de consumo oral, las más habituales, este proceso se halla fundamentalmente mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Petersen, Erwin y Deitrich, 1983). Esta enzima cataliza la conversión reversible de los alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas utilizando NAD (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido) como cofactor. En los seres humanos, pero también en roedores, la ADH es un sistema que

implica varios genes y alelos que dan lugar a diferentes subtipos de enzimas. Las distintas isoenzimas se han agrupado en tres clases, ADH clase I, ADH clase II y ADH clase III. Las ADH se encuentran en el citoplasma celular y poseen varias isoformas con distinta afinidad por el sustrato. Cada isoforma está genéticamente determinada y varía entre los distintos grupos étnicos, esto explica la razón por la cual algunos grupos raciales poseen mayor velocidad de metabolización del etanol.

Los dos sistemas enzimáticos hepáticos restantes posibilitan esta misma reacción adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol (Qulali y Crabb, 1992; Qulali, Ross y Crabb, 1991; Rachamin, MacDonald, Wahid, Clapp, Khanna e Israel; Techke y Heymman, 1980) o alguna deficiencia en el sistema principal. Estos dos sistemas son el llamado sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrógeno. El SMOE tiene importancia en la patogenia del daño hepático, dado que el metabolismo del alcohol por su intermedio genera la producción de radicales libres y superóxido (Borson, 1993). Se lo localiza en el retículo endoplásmico de las células, es miembro de la familia de los citocromos microsomales P450. Por su parte la catalasa es una enzima tetramérica con un grupo hemo en cada subunidad. El gen de la catalasa humana ha sido localizado en el cromosoma 11 (Goth y Pay, 1996). Se encuentra en todos los organismos aeróbicos y todo indica que su función es degradar rápidamente peróxido de hidrógeno

2.4 FARMACOLOGÍA DEL ALCOHOL

El estudio de las acciones, propiedades y efectos del etanol, así como de todas aquellas facetas de su interacción con los sistemas biológicos, por medio de procesos químicos, ha sido un tema complejo de abordar. Juárez, Vázquez y Barrios, (2005) se refieren a la dependencia física como una manifestación de reacciones adaptativas intracelulares al efecto depresivo que el etanol ejerce en los procesos metabólico, fisiológico y bioquímico en el cerebro.

Las diversas células del sistema nervioso logran funcionar regularmente, aún en presencia de niveles de alcohol que son tóxicos, gracias a que surgen adaptaciones compensatorias en dichos sistemas, las cuales constituyen el mecanismo que desencadena la llamada tolerancia fisiológica y reproducen una hiperactividad que compensa la función de células nerviosas para contrarrestar el efecto inhibitorio del alcohol. Al suspender la conducta de beber las neuronas hiperactivas cerebrales, al no estar deprimidas ya por el alcohol, crean excitabilidad excesiva a través del sistema nervioso y por ende aparece el síndrome de abstinencia (Kalant, 1996).

Existen estudios recientes que muestran que los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y de péptidos opioides cerebrales, están involucrados directamente en el efecto reforzante del alcohol (Terenius, 1996; Tomkins Y Sellers, 2001; Gianoulakis, 2001; Schuckit, 2000). La serotonina, dopamina, noradrenalina y los péptidos opioides, participan entonces en el mantenimiento de la conducta del beber. Diversas investigaciones han encontrado que el etanol incrementa el metabolismo de dopamina, tras su administración, situación en la cual el sistema opioide, participa como mediador (Strother, Chernet, Lumeng, Li TK. y McBride, 2001; Gianoulakis 2004). El consumo de esta droga se ve afectado cuando se administran péptidos opioides exógenos, y a su vez el alcohol altera la actividad del sistema opioide endógenos.

A nivel de los receptores de dopamina, neurotransmisor del placer, las neuronas dopaminérgicas A9 y A10, se localizan en el sistema mesolímbico y a nivel del núcleo accumbens. Ellas se asocian con los efectos estimulantes y euforizantes del alcohol. A nivel de los receptores GABA, el alcohol estimula el receptor GABA tipo A, el que ejerce una acción inhibitoria neuronal; es el que se asocia a los efectos sedativos (depresores) del alcohol. A nivel de los receptores opioides, el alcohol activa el sistema opioide endógeno elevando los niveles de las B-endorfinas cerebrales, las que inducen un efecto de bienestar y euforia vinculado a la intoxicación. A nivel de los receptores Glutamato, que están vinculados a neurotransmisores excitatorios el N-metil-D-aspartato, provocan 2 tipos de efectos: durante la intoxicación, son inhibidos por el alcohol y contribuyen a los efectos de la intoxicación, se asocian, por ello con las lagunas mentales por alteración en la zona de procesamiento neuronal vinculado a la

memoria; mientras que durante la abstinencia tras el consumo crónico, son los responsables de los efectos excitatorios adversos de la abstinencia.

El etanol actúa como agente perturbador inespecífico de la membrana neuronal alterando tanto su permeabilidad como las propiedades de sus componentes lípidos. Los modelos de exposición crónica al alcohol, han provocado incremento en el número de receptores en el SNC, mismos que son sensibles a la dopamina, por lo que se ha inferido que los cambios en el sistema de neurotransmisión dopaminérgico, son importantes en los efectos que se observan con la administración de etanol. Se ha postulado que la dopamina liberada por el accumbens podría mediar hasta cierto punto el efecto recompensante de opioides, alcohol y de diversas drogas de abuso. El etanol también altera otros procesos celulares de neuro-transmisión, a través de la modificación de la actividad enzimática de los sistemas de generación de “segundos mensajeros”.

El uso crónico de alcohol puede llevar a depresión y a la ansiedad; el abuso de alcohol está presente en algunos trastornos mentales como psicosis, trastornos bipolares (30% a 50% de los casos), trastorno depresivo mayor, trastorno de ansiedad generalizada, dependencia a la nicotina y trastorno de personalidad antisocial (Ross, Glaser, y Germanson, 1988; Windle, Windle y Scheidt, 1995).

2.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ETANOL

En la actualidad se sabe que el etanol interactúa con determinadas proteínas situadas en la membrana neuronal y que son responsables de la transmisión de señales. No todas las proteínas de la membrana son sensibles al etanol, pero algunas cascadas de transducción de señales son altamente sensibles (Diamond y Gordon, 1997).

Entre los puntos en los que el etanol actúa se encuentran canales iónicos, transportadores, receptores, proteínas G y proteínas-kinasas. La interacción del etanol con sus proteínas diana da lugar a cambios en la actividad de numerosas enzimas,

chaperonas y reguladores de la expresión génica (Eckardt, File, Gessa, Gant , Guerri, Hoffman, Kalant, Koob, Li TK, Tabakoff, 1998; Stubbs y Slater, 1999).

La determinación de las proteínas responsables de los efectos del etanol abre la posibilidad de diseñar fármacos que compitan con el etanol en lugares lipofílicos específicos, pudiendo así bloquear o revertir determinados efectos sin alterar la función de otras proteínas de la membrana neuronal (Diamond y Gordon, 1997).

La mayor parte de las acciones del etanol se debe a su interacción con 2 receptores concretos: el receptor GABA y el receptor NMDA del glutamato. Aunque hay otros neurotransmisores inhibidores, el GABA es el neurotransmisor inhibidor por excelencia del SNC, las neuronas que lo utilizan como neurotransmisor disminuyen de manera transitoria las respuestas de otras neuronas a estímulos posteriores. Por el contrario el glutamato –junto con el aspartato- es el neurotransmisor excitador por excelencia del SNC, la respuesta de las neuronas inervadas por neuronas glutamatérgicas se ve aumentada. El etanol potencia la acción del GABA y antagoniza la acción del glutamato; consecuentemente a nivel cerebral, el etanol potencia al inhibidor e inhibe al excitador: sus acciones son propiamente las de un depresor del SNC (Nutt, 1999).

Las evidencias arrojadas por algunas investigaciones indican que gran parte de los canales iónicos pueden ser modulados por el etanol. A nivel de segundos mensajeros, es claro que la proteína-kinasa C, está implicada en muchas de las respuestas celulares del etanol, regulando la sensibilidad al etanol de diversos canales y receptores. El etanol parece potenciar también la producción de AMPc mediada por receptores, lo que podría explicar parte de sus efectos intracelulares.

La exposición prolongada al etanol aumenta el crecimiento de las dendritas y axones neuronales en diferentes regiones cerebrales. Este incremento en la longitud de las neuritas probablemente altera la función cerebral retrasando la conducción eléctrica e interfiriendo en la remodelación sináptica, que interviene en los procesos de aprendizaje y en el desarrollo.

Parte de las acciones celulares que el etanol produce a largo plazo podrían inducir alteraciones en la expresión génica o ser consecuencia de ella. La exposición crónica al etanol altera la expresión de muchos genes, como el de la proopiomelanocortina, el del transportador de glucosa, el de la tirosin-hidroxilasa, diversas isoformas de proteína-kinasa C, etc. Entre las moléculas cuya expresión génica se ve aumentada por el alcohol se encuentran las chaperonas. Estas moléculas intervienen en el tráfico celular de proteínas y son necesarias para la inserción de proteínas en las membranas, lo cual sugiere que los cambios producidos por el etanol en el tráfico de proteínas contribuyen a la respuesta adaptativa del cerebro al etanol.

El responsable de los efectos reforzantes del alcohol es el denominado circuito de recompensa. Con este nombre se describe una red neuronal que se encuentra en el centro del cerebro y que se encarga de producir una sensación de placer en respuesta a determinados comportamientos. Existen acciones naturales como comer, beber o la actividad sexual que activan este circuito. Así mismo las drogas encienden este circuito y se obtiene por resultado la adicción. Los protagonistas principales son tres regiones del cerebro donde se sitúa el circuito de recompensa: el ATV, el NA y el cortex prefrontal. En el centro de la acción placentera se encuentra un neurotransmisor, la dopamina. Después de consumir algún tipo de droga, las neuronas del ATV envían dopamina a las otras dos regiones cerebrales, y éstas se encargan de producir la sensación de bienestar. El crucial componente dopaminérgico del sistema de recompensa es modulado por una amplia variedad de sistemas neurales, los cuales utilizan diversos neurotransmisores (GABA, glutamato, serotonina, noradrenalina, opioides, etc.). Estos sistemas neurales parecen tener importancia en el establecimiento del tono hedónico llevado a cabo por el sistema de recompensa dopaminérgico.

Diversos estudios han logrado confirmar que directa o indirectamente, el etanol aumenta las descargas de las neuronas dopaminérgicas en el ATV, así como la liberación de dopamina en el núcleo accumbens de ratas con alta preferencia por etanol que en ratas con baja preferencia.

Entre los péptidos endógenos, aquellos cuya implicación es más clara son los péptidos opioides. El consumo de alcohol modula el sistema de β -endorfinas. El receptor opioide μ , está presente en los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas del ATV. Su activación por el etanol da lugar al encendido dopaminérgico y a la liberación de dopamina en el núcleo accumbens. La administración aguda o crónica de antagonistas opioides consistentemente reduce la autoadministración oral de etanol, lo que sugiere que, en condiciones normales, determinados péptidos opioides endógenos aumentan el reforzamiento etílico. El etanol incrementa las endorfinas extracelulares en el núcleo accumbens, sugiriendo que una atenuación de las propiedades reforzantes del etanol a través de antagonistas opioides podría estar relacionada a la inhibición de las acciones de endorfinas endógenas en el accumbens.

La utilización de antagonistas nicotínicos ha mostrado la importancia de los receptores nicotínicos centrales en las acciones reforzadoras del etanol. Se postula que los receptores nicotínicos del ATV pueden mediar gran parte de las propiedades reforzadoras del etanol, tanto en este núcleo como en el resto del sistema mesolímbico dopaminérgico. Los últimos avances neurocientíficos han permitido profundizar en la fisiopatología del alcoholismo a nivel bioquímico y celular. Aunque no están tan bien comprendidas las propiedades reforzadoras del etanol parecen estar mediadas fundamentalmente por la activación de receptores GABA_A, la liberación de péptidos opioides, la interacción con receptores nicotínicos y la liberación indirecta de dopamina.

Ping Chen, Kuhn, Chaturvedi, Boyadjieva y Sarkar (2004) realizaron un estudio para demostrar que el etanol reduce los niveles celulares de AMPc y que el TGF- β 1 regula la señalización apoptótica que induce muerte celular en células hipotálamicas en desarrollo de cultivos primarios, así como, identificar a las neuronas β -e como un blanco del etanol. Sus hallazgos mostraron activación de moléculas apoptóticas e inactivación de moléculas antiapoptóticas que son reguladas por el TGF- β 1 en neuronas β -e tras el tratamiento con etanol o el inhibidor de la adenilato ciclasa. La exposición a largo plazo actuando directamente o vía la reducción de niveles celulares de AMPc estimula la señalización TGF- β 1 que sobregula proteínas proapoptóticas pero que

suprime proteínas antiapoptóticas para mediar la acción apoptótica del etanol sobre neuronas β -e.

2.6 SISTEMA OPIOIDE

Los opioides son péptidos naturales que interaccionan con receptores neuronales específicos generando potenciales pos-sinápticos de membrana de tipo inhibitorio o inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Mazana, 2001). Ambos, péptidos y receptores se hallan profusamente distribuidos en el SNC, lo que evidentemente indica un importante papel fisiológico de este sistema opioide.

Hasta ahora se han identificado a tres familia de péptidos endógenos: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Los cuales son generados a través de procesamiento enzimático de tres moléculas precursoras diferentes y presentan una distribución característica en el cerebro. Los precursores inmediatos son:

Pro-opiomelanocortina, precursora de las β -endorfinas, las cuales son sintetizadas por neuronas del núcleo arcuato hipotalámico principalmente; dichas células proyectan al ATV, NA, séptum, amígdala, hipocampo, corteza frontal y área gris periacueductal. También se ha detectado síntesis de β -endorfina en neuronas del núcleo del tracto solitario. En la periferia, la glándula hipófisis ha sido identificada como sitio de síntesis para dichos péptidos opioides. Se las localiza especialmente en el lóbulo intermedio de la hipófisis. La β -endorfina es el opioide endógeno más importante en el cuerpo humano, y es el responsable de múltiples sensaciones placenteras en el organismo, además de ser un potente analgésico (Mazana, 2001).

Proencefalina, precursora de la molécula de 4-metionina (met) encefalina y de cada met-encefalina; met-encefalina-Arg-Phe; met-encefalina-Arg-Gly-Leu y Leu-encefalina. Se localiza a las encefalinas ampliamente distribuidas en el SNC, pero especialmente en el diencefalo y tronco encefálico.

Prodinorfina, precursora de dinorfinas, α -neoendorfinas y Leu-encefalinas. Células nerviosas que sintetizan encefalinas y dinorfinas están distribuidas en todo el SNC, en especial en hipocampo y médula espinal.

Los genes que codifican para los precursores son muy similares, lo que puede indicar que tienen una vía evolutiva en común, el gen de POMC se encuentra en el cromosoma 2 (Santos, Martínez, Pérez y Albala, 2005) y el gen de proencefalina en el cromosoma 12.

Cada uno de estos péptidos codifican con receptores particulares y ejercen funciones específicas en el SNC. Son capaces de influir sobre una gran variedad de procesos conductuales y fisiológicos: el dolor, regulación de la temperatura, respiración y respuestas cardiovasculares. Presentan propiedades psicotrópicas, analgésicas, hedónicas y participan en la modulación del estado de ánimo y en aspectos motivacionales y emocionales de la conducta. Cuando nos enfrentamos a situaciones de ejercicio, alimentación, la actividad sexual se liberan en el cerebro este tipo de sustancias ejerciendo un efecto placentero.

Existen 3 tipos de receptores opioides los cuales pertenecen a la familia de receptores transmembranales acoplados a proteínas G: μ , δ , y κ , actualmente se han descrito 3 categorías de los mismos: * μ 1 y μ 2; * κ 1a, 1b, 2a y 2b; * δ 1 y δ 2.

Los diferentes ligandos de opioides endógenos muestran cierta preferencia para los distintos receptores, las β -endorfinas para los μ , las encefalinas para los δ y las dinorfinas para los κ (Van Ree, Niesink, Van Wolfswinkel, Ramsey, Kornet, Van Furth, Vanderschuren, Gerrits y Van den Berg, 2000).

Los receptores μ representan el 22 % de los receptores opioides, los receptores δ el 35% y los receptores κ el 24%, entre los tres reúnen el 99% de los receptores para opioides. Hoy se sabe que existen receptores diferentes presentes en una misma célula, lo que se llama co-neurotransmisión (Acuña, 2002).

2.7 OPIOIDES Y ALCOHOL

El alcohol modifica la actividad de los sistemas neuronal y neuroendocrino por medio de alteraciones en varios sistemas de neurotransmisores y neuromoduladores. Los estudios sobre los mecanismos de adicción de drogas que, como el alcohol, son fuertemente reforzadoras y adictivas, sugieren que la dopamina, la serotonina, el ácido γ -aminobutírico (GABA), el glutamato y el sistema opioide juegan un papel importante en estos procesos (Gianoulakis, 1993; Hunt, 1993; Ulm, Volpicelli y Volpicelli, 1995).

Se ha postulado al sistema opioide como posible mediador de los efectos reforzadores positivos del alcohol. El consumo de la sustancia es alterado por la administración de péptidos opioides exógenos, y el alcohol, a su vez, afecta la actividad del sistema opioide. El etanol modifica la síntesis y la liberación de algunos péptidos opioides, así como la actividad de los receptores opiáceos μ y δ . Por otro lado, la administración de antagonistas selectivos de dichos receptores, reduce la preferencia por el alcohol y la ingesta de la sustancia en animales. Los antagonistas opiáceos como la naltrexona, reducen las propiedades reforzadoras del alcohol en bebedores sociales y disminuyen la ingesta excesiva de la sustancia. En consecuencia, es posible que la preferencia por el alcohol esté asociada con una activación aumentada del sistema opioide.

El alcohol y los péptidos opioides comparten muchas características farmacológicas y exhiben efectos similares sobre el comportamiento en animales y en el hombre. Como la cocaína y las anfetaminas, el alcohol y los opioides estimulan la actividad motora a través de la activación del circuito dopaminérgico del tracto medial del cerebro anterior (Imperato, Di Chiarra, 1986; Wise R. A., 1980; Wise y Bozarth, 1987) vía que también es activada por estimulación eléctrica cerebral de recompensa.

Como el alcohol, los opioides exhiben efectos bifásicos sobre la actividad locomotora. Dosis bajas producen activación psicomotora y euforia, mientras que dosis altas causan sedación (Frye y Breese, 1981; Wise et al. 1987). Ambos tipos de sustancias pueden ser

autoadministradas hasta el punto del abuso y producir tolerancia y dependencia física. Observaciones clínicas muestran que la ingesta del alcohol disminuye en sujetos dependientes de opioides, mientras que en los periodos de privación de éstos el consumo de alcohol aumenta considerablemente. Esto sugiere que el alcohol y los opioides tienen efectos farmacológicos similares y mecanismos biológicos comunes. Wise et al. (1987) han sugerido que la dependencia al alcohol y a los opioides podría estar mediada por un mecanismo común que involucra vías dopaminérgicas de reforzamiento en el cerebro.

Se ha sugerido que las propiedades reforzadoras del alcohol se deben, al menos en parte, a la activación del sistema opioide por el alcohol (Ulm et al. 1995). Esta hipótesis proviene de varias líneas de investigación, en las que, por un lado, se estudian los efectos de la administración de péptidos opioides exógenos sobre el consumo del alcohol y sobre respuestas asociadas a mecanismos de reforzamiento positivo, y por el otro, las modificaciones ejercidas por la administración de la sustancia sobre los sistemas opioides. A continuación se mencionan algunas evidencias que apoyan dicha hipótesis:

1. El hipotálamo, el séptum y el núcleo accumbens, regiones cerebrales que juegan un papel importante en los efectos reforzadores positivos de muchas drogas de abuso, son ricas en encefalinas y endorfinas (Gianoulakis, 1993)
2. Los opiáceos afectan la preferencia y el consumo de alcohol dependiendo de la dosis administrada y de la previa exposición a éstos. La administración de bajas dosis de agonistas de receptores opiáceos del tipo μ , como la morfina aumentan la preferencia y la ingesta de alcohol en animales (Reid y Hunter 1984; Wild y Reid, 1990), mientras que dosis moderadas-altas las reducen (Volpicelli, Ulm y Hopson, 1991). Por otra parte, en condiciones de privación de opiáceos, los animales parecen compensarla aumentando la ingesta de alcohol (Ho AK y Chen, 1976). De la misma manera individuos dependientes de opioides incluidos en terapias de sustitución (metadona), generalmente ingieren más alcohol (El-Bassel, Schilling, Turnbull y Su, 1993).

3. Los antagonistas no específicos de receptores opiáceos, como la naloxona y la naltrexona, disminuyen consistentemente la autoadministración de alcohol en roedores y monos en una gran variedad de condiciones experimentales (Froehlich, 1995; Froehlich, Harts, Lumeng y Li T. K., 1990; Myers, Borg y Mossberg, 1986; Reid et al. 1984; Ulm et al. 1995) y reducen tanto el número de episodios de recaídas como el tiempo de latencia entre ellos, en pacientes alcohólicos abstinentes(O'Malley, Jaffe, Chang, Schottenfeld, Meyer y Rounsaville, 1992; Volpicelli, Alterman, Hayashida y O'Brien,1992).

4. La administración central y periférica de péptidos del tipo de las endorfinas y las encefalinas, así como la de análogos opiáceos, produce respuestas asociadas a mecanismos de reforzamiento positivo, mientras que la administración de antagonistas opiáceos, bloquea estas respuestas (Bozarth y Wise 1984; Shippenberg, Herz, Spanagel, Bals-Kubik y Stein, 1992; Van Wolfswinkel y Van Ree, 1985).

5. Numerosos estudios en animales y en humanos han demostrado que el alcohol altera la actividad del sistema opioide endógeno (Gianoulakis, 1993; Ulm et al. 1995).

6. Evidencias recientes sugieren una posible predisposición genética relacionada con el consumo de alcohol, tanto en roedores como en el hombre (De Waele, Papachristou y Gianoulakis, 1992; Gianoulakis et al. 1989), que puede estar asociada con una responsividad aumentada del sistema opioide al alcohol.

El conjunto de estos datos indica que la activación del sistema opioide en respuesta a la ingesta de alcohol puede aumentar el valor hedónico y el efecto reforzador de la sustancia, lo cual a su vez incrementaría la ingesta de alcohol. Este tipo de mecanismo podría ser importante para el establecimiento eventual de una conducta adictiva.

A continuación se intenta describir de manera detallada, los mecanismos a través de los cuales el alcohol puede modificar la transmisión de péptidos opioides en el cerebro.

Biosíntesis de péptidos opioides. Se conoce muy poco sobre la expresión de los genes asociados a la síntesis de los péptidos opioides en relación a los mecanismos de activación del sistema opioide por alcohol.

El contenido de RNAm de Proopiomelanocortina (POMC) (precursor de la β -endorfina y otros péptidos biológicamente activos) en la hipófisis y el hipotálamo de cepas de roedores que prefieren alcohol, es superior al detectado en las cepas correspondientes que no prefieren alcohol (De Waele et al. 1992). De la misma manera, los niveles de péptidos derivados de POMC también son distintos en ambas líneas de ratas (Gianoulakis, De Waele y Kiianmaa, 1992).

Además un tratamiento agudo con alcohol produce un mayor incremento en el contenido de RNAm de POMC en los lóbulos anterior y neurointermedio de la hipófisis de ratas P que en las ratas NP (Froehlich, 1995). Estos resultados sugieren por un lado, que el alcohol puede afectar la síntesis de péptidos opioides como la β -endorfina, y por otro, que existe una sensibilidad aumentada del sistema de endorfina al alcohol en las líneas de roedores que prefieren alcohol, la cual parece estar asociada con una predisposición genética hacia el alto consumo de la sustancia. El conjunto de estos resultados muestra que la síntesis de péptidos opioides en el cerebro es afectada por la administración de alcohol en forma diferencial según la cepa de animales y la región cerebral estudiada.

Liberación de péptidos opioides. A nivel neuroendocrino, el alcohol tiene efectos reforzadores a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y se ha mostrado que el consumo de la sustancia está asociado con la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), β -endorfina y glucocorticoides (Lukas y Mendelson, 1988; Noth y Walter, 1984). Se ha propuesto que la liberación de estas hormonas podría estar relacionada con algunos de los efectos eufóricos y ansiolíticos del alcohol (Lukas et al. 1988; Pohorecky, 1991).

Diversos estudios en animales han mostrado que la exposición al alcohol modifica el contenido y la liberación de β -endorfina. La administración aguda intragástrica (Patel y

Pohorecky, 1989) o intraperitoneal (Ho Aks y Allen, 1981) de alcohol, así como el tratamiento crónico con la sustancia (Seizinger, Bovermann, Holtt y Herz, 1984) aumentan respectivamente, los niveles plasmáticos (Ho Aks et al. 1981; Patel et al. 1989) hipotalámicos (Patel et al. 1989), y el contenido y la liberación in vitro de endorfina en la adenohipófisis (Seizinger et al. 1984). Por otra parte, los niveles basales de β -endorfina en el núcleo accumbens de las ratas P son inferiores a los detectados en las ratas NP, pero éstos son semejantes en el hipotálamo de estas cepas de ratas.

En el caso del hombre, dosis moderadas de alcohol aumentan los niveles periféricos de β -endorfina en bebedores sociales con una historia familiar de dependencia de alcohol, mientras que la sustancia no afecta los niveles del péptido en sujetos sin historia familiar de dependencia (Gianoulakis et al. 1989).

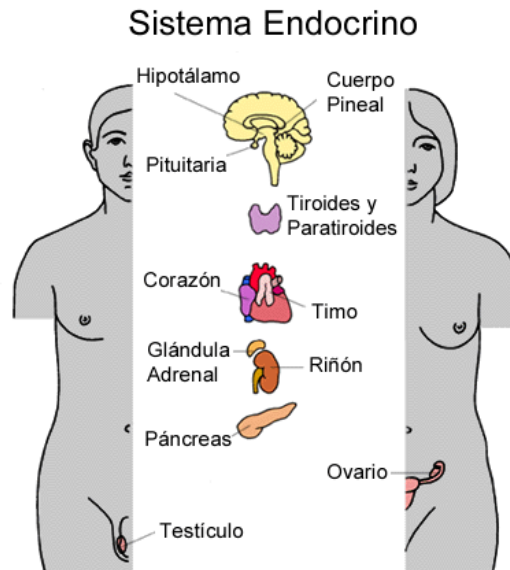
Se puede pensar que el alcohol estimula la liberación de péptidos opioides en el cerebro, aumentándose así la motivación para consumir la sustancia (Di Chiara, Acquas y Tanda, 1996). La liberación de dopamina del núcleo accumbens inducida por alcohol es bloqueada por antagonistas no específicos de receptores opiáceos, como la naltrexona (Benjamin, Grant y Pohorecky, 1993). Estos datos sugieren que el alcohol probablemente no estimula directamente la liberación de dopamina en las vías cerebrales de recompensa, sino que más bien estimula la liberación de péptidos opioides que a su vez activan al sistema dopaminérgico.

Activación de receptores opiáceos. Algunos estudios-muestran que el alcohol tiene mayores efectos sobre subtipos particulares de receptores opiáceos y que la actividad de éstos depende de la dosis y del tiempo de exposición a alcohol. Estudios in vitro muestran que dosis bajas de alcohol a largo plazo aumentan la unión de opiáceos a receptores μ , mientras que dosis altas la reducen (Tabakoff y Hoffman, 1983). Sin embargo, la exposición al alcohol a largo plazo reduce la actividad de receptores μ en ratones (Hoffman, Urwyler y Tabakoff, 1982). Por lo tanto, los efectos de dosis de alcohol a corto plazo probablemente contribuyen a los efectos reforzadores iniciales de la sustancia.

La administración de naloxona a ratas que prefieren alcohol suprime selectivamente y en forma dependiente de la dosis la ingesta de la sustancia, sin alterar la de agua (Froehlich et al. 1990). A bajas dosis, la naloxona es eficaz para antagonizar los receptores μ , con un ligero antagonismo de los receptores δ o κ , mientras que altas dosis antagonizan receptores μ y δ (Chang y Cuatrecasas, 1981; Chang, Cooper, Hazum y Cuatrecasas, 1979). El hecho de que dosis altas de naloxona supriman el consumo de alcohol de manera más efectiva que las dosis bajas, sugiere que tanto los receptores μ como los δ juegan un papel importante en el comportamiento de ingesta de alcohol.

Ya que las endorfinas tienen mayor afinidad por los receptores μ , y las endorfinas y las encefalinas por los receptores δ (Raynor, Kong, Chen, Yasuda, Yu y Bell, 1994), y dado que los antagonistas de receptores opiáceos, particularmente los selectivos para estos receptores, disminuyen el consumo de alcohol sin alterar la ingesta de agua y comida, se puede pensar que la activación de los sistemas endorfinérgico y encefalinérgico juega un papel importante en comportamientos relacionados con el mantenimiento de un alto consumo de alcohol. El conjunto de estos datos sugiere entonces la participación de los receptores μ y δ en los mecanismos de reforzamiento del alcohol.

El conjunto de las evidencias anteriormente expuestas sugiere que los sistemas opioides en el cerebro actúan como mediadores de los efectos reforzadores positivos del alcohol. Esta modulación parece llevarse a cabo a través de la activación de vías opioides por el propio alcohol. De esta manera, puede pensarse que el alcohol podría afectar eventos específicos de la transmisión de péptidos opioides, y que estos efectos podrían ocurrir en áreas particulares del cerebro. Además de estos eventos de la transmisión de péptidos opioides, otras etapas, como el transporte y el procesamiento de los precursores, la inactivación de los péptidos activos, y los mecanismos intracelulares de transducción que siguen a la activación de los receptores involucrados, podrían ser también afectadas en forma específica por el alcohol.



(Fig. 2 Esquema que muestra las principales glándulas que conforman al sistema endocrino)

El sistema endocrino u hormonal es un conjunto de órganos y tejidos del organismo que liberan un tipo de sustancias llamado hormonas. Los órganos endocrinos también se denominan glándulas sin conducto o glándulas endocrinas, debido a que sus secreciones se liberan directamente en el torrente sanguíneo, mientras que las glándulas exocrinas liberan sus secreciones sobre la superficie interna o externa de los tejidos cutáneos, la mucosa del estómago o el revestimiento de los conductos pancreáticos.

Las hormonas secretadas por las glándulas endocrinas regulan el crecimiento, el desarrollo y las funciones de muchos tejidos, y coordinan los procesos metabólicos del organismo. Por ello se dice que el sistema endocrino actúa como una red de comunicación celular que responde a los estímulos liberando hormonas y es el encargado de diversas funciones metabólicas del organismo, entre ellas:

- Controlar la intensidad de funciones químicas en las células
- Registrar el transporte de sustancias a través de las membranas celulares
- Regular el equilibrio (homeostasis) del organismo
- Hacer aparecer las características sexuales secundarias

- Otros aspectos del metabolismo de las células, como crecimiento y secreción.

El sistema endocrino está formado básicamente por las siguientes glándulas endocrinas (que secretan sus productos a la sangre): hipófisis, hipotálamo, tiroides, glándulas paratiroides, ovario, ó testículos, páncreas y glándulas suprarrenales.

Las hormonas son definidas como sustancias liberadas por una glándula endocrina, y son transportadas a través del torrente sanguíneo a otro tejido para actuar regulando funciones de un órgano blanco. La manera en la cual ejercen estas acciones es a través de la unión de la hormona a moléculas receptoras. Éstos receptores distinguen a las hormonas de otros millones de moléculas a las que están expuestos (Baxter, 1997). De acuerdo con el concepto tradicional, las hormonas son sustancias secretadas por un tejido específico y transportadas a distancia donde ejercen su acción sobre otros tejidos.

2.8.1 CLASIFICACIÓN

Las hormonas pueden ser clasificadas considerando los siguientes factores: unión a proteínas transportadoras en sangre, vida media en plasma, solubilidad en agua o lípidos, ubicación de receptores celulares, tipo de mediador intracelular y si pueden o no cruzar la barrera hematoencefálica (Juárez, 2001). Las hormonas más conocidas pertenecen a tres grupos químicos: proteínas, esteroides y aminas.

Aquellas que pertenecen al grupo de las proteínas o polipéptidos incluyen las hormonas producidas por la hipófisis anterior, paratiroides, placenta y páncreas. Los aminoácidos tienen una función importante en la formación de péptidos y proteínas, en este caso los aminoácidos se unen entre sí de manera covalente para formar los enlaces peptídicos. Las proteínas son macromoléculas formadas por una o varias cadenas de polipéptidos y se sintetizan en los ribosomas, el proceso se inicia a partir de un gen que transfiere la información al ácido ribonucleico mensajero y se inicia la transducción, para luego empaquetarse en forma de gránulos para su posterior secreción (Virgen, 2002).

En el grupo de esteroides se encuentran las hormonas de la corteza suprarrenal y las gónadas. Los esteroides son compuestos cuya estructura fundamental es el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno de 17 carbonos. Estas hormonas se forman a partir del colesterol vía pregnenolona, que representa la hormona progenitora de todos los esteroides. La síntesis de los esteroides ocurre en el retículo endoplásmico liso y la mitocondria.

Las aminas son compuestos que se derivan de un aminoácido y son sintetizados en el citoplasma de la célula por una serie de fases enzimáticas, además son producidas por la médula suprarrenal y el tiroides.

2.8.2 SÍNTESIS Y SECRECIÓN HORMONAL

Las hormonas circulantes interactúan con las células blanco en mayor o menor grado de acuerdo a su concentración plasmática y a su afinidad por el receptor principalmente. La concentración depende de la velocidad de síntesis, liberación, degradación y eliminación. Las hormonas se segregan de manera pulsátil, con pulsos cortos (de forma que logran evitar la regulación de receptores a la baja), o largos de acuerdo a ritmos circadianos. La síntesis de hormonas tiene lugar en el interior de las células y, en la mayoría de los casos, el producto se almacena en su interior hasta que es liberado en la sangre. Sin embargo el tiroides y los ovarios contienen zonas especiales para el almacenamiento de hormonas. Algunas hormonas pueden sintetizarse y liberarse en las neuronas y ser localmente activas en donde se secretan (Del Río, 1996).

La liberación de las hormonas depende de los niveles en sangre de otras hormonas y de ciertos productos metabólicos bajo influencia hormonal, así como de la estimulación nerviosa. El mecanismo a través del cual los niveles hormonales circulantes se mantienen en equilibrio constante, se conoce como homeostasis o retroalimentación negativa. La liberación de hormonas está regulada también por la cantidad de sustancias circulantes en sangre, cuya presencia o utilización queda bajo control hormonal. La función endocrina está regulada también por el sistema nervioso, como demuestra la respuesta suprarrenal al estrés. Los distintos órganos endocrinos están

sometidos a diversas formas de control nervioso. La médula suprarrenal y la hipófisis posterior son glándulas con rica inervación y controladas de modo directo por el sistema nervioso. Sin embargo la corteza suprarrenal, el tiroides y las gónadas, aunque responden a varios estímulos nerviosos, carecen de inervación específica.

2.8.3 RECEPTORES HORMONALES

A cada hormona le corresponde un receptor, los receptores son proteínas que reconocen específicamente a su hormona, ya que son sintetizados por la propia célula con la finalidad de poder responder a esa hormona determinada. Por regla general, mientras más receptores tenga una célula para una hormona dada, más sensible será al control que el sistema endocrino quiera ejercer sobre esa célula.

Cuando una hormona es secretada al torrente sanguíneo llega a los órganos blanco e interactúa con ellos a través de los receptores, produciendo un determinado efecto, que generalmente consiste en la síntesis de nuevas proteínas. Se ha encontrado que existen dos tipos de receptores hormonales: receptores de membrana que se fijan a proteínas localizadas en la membrana celular, y receptores localizados dentro de las células o nucleares, como en el caso de la familia de las hormonas esteroides tiroideas. El complejo hormona-receptor se forma debido a la afinidad existente entre el receptor y la hormona correspondiente.

2.8.4 ESTEROIDES SEXUALES

Entre las señales hormonales que afectan el desarrollo y la función cerebral, las hormonas gonadales tienen un papel destacado. Estos esteroides cruzan la barrera hematoencefálica y actúan sobre diferentes poblaciones de neuronas que expresan sus receptores. Actuando sobre el SNC, las hormonas gonadales regulan una amplia variedad de funciones neuroendocrinas y comportamentales, incluyendo la regulación de la secreción de gonadotropinas y la regulación del comportamiento sexual. Estos esteroides endógenos, conocidos como neuroesteroides, afectan la función cerebral

actuando sobre los receptores para aminoácidos neurotransmisores. Tanto la corteza de las glándulas suprarrenales como las gónadas son productoras de hormonas esteroides. Los esteroides pertenecen al grupo de “derivados lipídicos”. Son un grupo heterogéneo de ácidos grasos insolubles en agua. Tienen una estructura básica similar que consiste en un complejo de anillos hidrocarbonatos fusionados.

El más importante de la familia de los esteroides es el colesterol, que es precursor metabólico primario de otros esteroides más importantes, incluyendo ácidos biliares y hormonas sexuales, se ha descrito que el acetato es el precursor primario para la síntesis de todos los esteroides. La vía implica la síntesis inicial del colesterol, el cual, después de una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones en pregnenolona, un esteroide del cual derivan todas las demás hormonas esteroides, la convierte en el citosol en progesterona por una deshidrogenasa, o en 17-hidroxipregnenolona por una 17-hidroxilasa específica. Estos esteroides se convierten en toda una gama de hormonas activas en el retículo endoplásmico y las mitocondrias mediante oxigenasas y deshidrogenasas específicas.

El hipotálamo y la hipófisis están involucrados en la secreción de las hormonas sexuales por las gónadas. En el hipotálamo se secretan diversos factores liberadores que facilitan la producción de las hormonas gonadotrópicas producidas por la hipófisis. Las hormonas gonadotrópicas, como la foliculo-estimulante y la luteinizante, estimulan la producción de las hormonas gonadales: testosterona (producida en mayor cantidad en los machos), estrógenos y progesterona (con niveles más elevados en la hembra).

2.8.5 ESTRÓGENOS

Los estrógenos esteroides naturales se forman a partir de andrógenos androstenediona o testosterona por acción de enzimas aromatasas. Los ovarios son la principal fuente de estrógenos en mujeres premenopáusicas y el estradiol es el producto principal. Estas hormonas son responsables del desarrollo y mantenimiento del fenotipo femenino y actúan tanto en el nivel periférico como del SNC afectando por ende la conducta de las

diversas especies animales (Juárez, 2001). Los estrógenos tienen efectos importantes a nivel central, donde actúan en estructuras que participan en aspectos motivacionales de la conducta sexual.

Ramos (2001) hace hincapié en la importancia de los estrógenos sobre el estado anímico en diversos períodos de la vida, afectándolo en la etapa posterior al parto, en la fase premenstrual del ciclo y en la menopausia, además las observaciones realizadas sobre las alteraciones en el estado de ánimo revelan que se dan cuando tiene lugar una disminución en los valores de estrógenos. Cuando se administra terapia de sustitución hormonal en mujeres menopáusicas que presentan cuadros depresivos, se logran disminuir los síntomas del trastorno (Hilakivi, 1996). El consumo de alcohol incrementa los niveles de estrógenos en sangre y orina en mujeres posmenopáusicas que beben menos de una bebida alcohólica por día (Gavaler y Van Thiel, 1992), sugiriendo estos hallazgos que, un consumo moderado de alcohol podría ayudar a prevenir eventos indeseables característicos de esta etapa.

El ovario produce principalmente 2 tipos de esteroides: los estrógenos (que se originan en el folículo en desarrollo) y los progestágenos, que se producen a nivel del cuerpo lúteo (Luquín, 1995). En el plasma de la hembra se encuentran 3 estrógenos importantes; 17β -estradiol, estrona y estriol. La acción biológica del estradiol en el cerebro de la rata se lleva a cabo principalmente en el área preóptica del hipotálamo anterior y medial, el tectum, el núcleo arcuato, la amígdala y el área hipotalámica ventromedial (Kubli, 1993). Todas estas estructuras del sistema límbico involucran un gran número de receptores a opioides (Blum y Paine, 1991), y de manera especial el hipotálamo. Se ha correlacionado un incremento en la actividad eléctrica de neuronas hipotalámicas en presencia de estradiol. Sugiriendo que las hormonas afectan directamente la excitabilidad de la membrana celular de éstas células (Hutchinson, 1984).

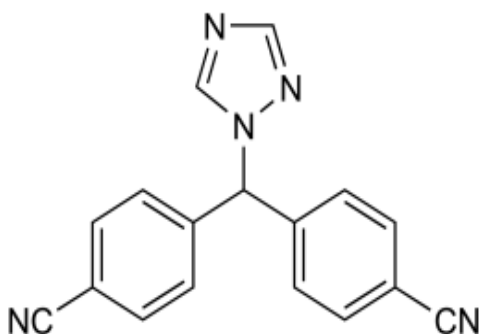
Es evidente la importancia del estradiol en los ciclos menstruales de los primates y estrales de otras especies de mamíferos debido a su acción conjunta con la progesterona y con otros eventos neuroendocrinos a nivel hipotálamo e hipofisiario. Juárez (2001), sostiene que la administración de estrógenos a hembras intactas produce una inhibición de la secreción de gonadotropinas, y por ende, de la ovulación, sin embargo menciona que, es posible inducir estro o celo tanto en hembras intactas como en ovariectomizadas cuando se administran estrógenos, aunque es más efectivo ese resultado cuando éstos van seguidos de progesterona, lo cual, enmendaría la ciclicidad hormonal endógena.

2.8.6 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los efectos fisiológicos del estradiol son distribuidos a través del cuerpo por proteínas receptoras de estrógenos localizadas en las células. Lo que determina si una célula utiliza el estradiol es si esa célula posee una proteína receptora en su núcleo. Dichas células poseedoras del receptor de estrógeno, son llamadas células diana de estrógeno, e incluyen a las que forman los tejidos que componen el útero, cérvix, vagina, ovario, mama, próstata, sistema cardiovascular, el hueso, adenohipófisis y eminencia media hipotalámica. El receptor de estrógenos (RE) constituye un ejemplo de proteína que se une específicamente a una hormona determinada. Como cualquier otra proteína, también el RE está codificado en el ADN, con la particularidad de que existen 2 tipos diferentes de RE de acuerdo al punto de vista estructural, uno denominado α , porque fue el primero que se descubrió, y cuyo gen codificador se encuentra en el cromosoma 6 y el otro, lógicamente, denominado β , por haber llegado más tarde y cuyo gen se encuentra en el cromosoma 14 (Brinton, 2001). Ambas formas se encuentran presentes en prácticamente todos los puntos clave de control neuroendocrino. De manera exclusiva, el RE β se encuentra en neuronas del bulbo olfatorio, núcleos hipotalámicos supraóptico, paraventricular, supraquiasmático, zona incerta, área Tegmental ventral, cerebelo, glándula pineal y varias láminas de la médula espinal; y el RE α está en el núcleo ventromedial del hipotálamo y en el órgano subfornical. De forma mixta, ambos

tipos de receptores se encuentran en áreas y núcleos cerebrales: amígdala, área preóptica, sustancia gris periacueductal, habénula lateral, núcleo parabraquial, locus coeruleus, núcleo del tacto solitario, núcleo espinal del trigémino, láminas superficiales de la médula espinal, hipocampo y corteza cerebral, si bien en estas dos últimas localizaciones son mucho más abundantes los RE β que los RE α (Shotaro Susuki y Handa, 2004). Esta diferencia tan sustancial en la localización cerebral de los dos tipos de RE indica que median funciones diferentes.

2.9 INHIBIDORES DE AROMATASA



Letrozol es un polvo cristalino blanco a amarillento, prácticamente inodoro, soluble en diclorometano, moderadamente soluble en etanol, y prácticamente insoluble en agua.

Fórmula estructural: C₁₇H₁₁N₅

Peso molecular: 285,31.

Inhibidor no esteroide de la enzima aromatasa, que se une al grupo hemo que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos.

Vida media: Presenta una vida media terminal de aproximadamente 2 días.

(Fig. 3 Fórmula química de Letrozol)

La enzima aromatasa es un complejo enzimático microsomal, el cual está compuesto a partir de una glicoproteína específica, la aromatasa citocromo P450, y una reductasa

ubicua. Cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos y se localiza sobre el retículo endoplásmico. Esta enzima se encuentra codificada en el gen Cyp19a, que contiene una región regulatoria inusualmente larga y en la mayoría de los mamíferos su expresión es controlada por dos promotores distintos: las gónadas y el cerebro (Stocco , 2008). En humanos está expresada en el ovario, testículos, cerebro, tejido adiposo y en la placenta, esta última es particularmente una rica fuente en esta enzima y por ello ha sido comúnmente usada para medir inhibidores de aromatasa. En la rata, el sitio primario de actividad aromatasa es el ovario (Odum et al., 2002). Takahashi, Bergström, Frändberg, Vesström, Watanabe y Langström (2006), reportan una distribución central específica de esta enzima, siendo en la rata macho la amígdala medial, la cama del núcleo de la estría terminal y el área preóptica, y en la rata hembra también la amígdala medial y la cama del núcleo de la estría terminal las estructuras marcadas. Esos hallazgos sugieren que la formación de compuestos aromáticos como el estradiol a través de la enzima aromatasa podría participar de manera significativa en estados emocionales y mentales.

Dado que el paso final en la biosíntesis de los estrógenos es mediado por la enzima aromatasa, los inhibidores de aromatasa ofrecen la mejor oportunidad de inhibir potente y selectivamente la biosíntesis de estrógenos (Woo, Sutcliffe, Bubern, Grasso, Chander, Purohit, Reed y Potter, 2003).

El aminoglutatimida fue el primer inhibidor de aromatasa establecido (1970) como un tratamiento activo para pacientes con cáncer de mama avanzado, pero su falta de especificidad fue asociada con efectos colaterales (Smith, 1999). Desde entonces, se han desarrollado series de inhibidores de aromatasa no esteroides mucho más específicos, los cuales son 10 000 veces más potentes que el aminoglutatimida en vivo, sin evidencia de inhibir otras vías esteroides al administrarlos a dosis requeridas para inhibir estrógenos. La nueva generación de estas drogas la forman: anastrozol, letrozol (no esteroides) y exemestan (esteroide).

Estos tres agentes difieren en términos de estructura y productos metabólicos y en el grado en que suprimen la actividad aromatasa, se ha demostrado que anastrozol y

letrozol tienen un efecto equivalente o superior que el tamoxifen (antagonista estrogénico) en mujeres con metástasis (Ligibel y Winer, 2003). Varios autores sostienen que los inhibidores de aromatasa representan una nueva clase de agentes que parecen ser más efectivos que los antiestrógenos, como el Tamoxifen, en el tratamiento de cáncer de mama, además de incrementar la supervivencia y presentar mayor tolerabilidad a éstos fármacos.

Letrozol (LTZ) (Femara, Novartis) es un agente que logra 98-99% de la inhibición de la enzima aromatasa (Smith, 1999), y por ende de la actividad estrogénica y reduce concentraciones en suero de Estrona y Estradiol más allá del límite de detección en muchos pacientes. Este agente no esteroide, presenta una vida media en plasma de 2 a 4 días, usando una dosis de 2.5 mg/día (Buzdar, 2003), inhibe la aromatasa periférica en un 98% y suprime los niveles de estrógenos en sangre y orina en un 95% tras 2 semanas de tratamiento en mujeres posmenopáusicas (Lamb y Adkins, 1998). Bhatnagar, Batzl, Häusler y Nogués. (1993), sostienen que el tratamiento con LTZ puede provocar una deprivación de estrógenos total en ratas hembras adultas con ciclos regulares, ya que mimetiza la secuela endocrina de una ovariectomía.

Odum et al. (2002) con el fin de probar in vitro la eficacia de varios inhibidores de aromatasa (anastrozol, fadrozol y Letrozol), removieron ovarios de ratas hembras maduras, y decidieron usar ovarios provenientes de ratas maduras porque la actividad aromatasa es mayor en éstas que en ovarios de ratas inmaduras, de hecho se ha demostrado que la actividad aromatasa en la rata varía durante el ciclo estral, y es mayor en la etapa de proestro (Brandt, Puett y Zimniski, 1990). Encontraron que la inhibición in vitro de la actividad aromatasa fue significativamente reducida por los tres inhibidores empleados.

Eshet, Maor, Ari, Eliezer, Gat-Yablonski, y Philip (2004), sostienen que la administración s.c. de Letrozol (LTZ) (2mg/kg), a ratones machos en etapa prepúber, incrementa significativamente los niveles de testosterona (T) en suero e incrementa el peso corporal y longitud de la cola de estos sujetos, pocas semanas después de su administración.

Hasan, Mehmet, Ilyas y Nurettin (2004), reportaron que en ratas tratadas con LTZ (administrado en una solución acuosa de carboximetilcelulosa 1%, vía oral) en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mg/kg/día, por un periodo de 21 días, es posible detectar niveles en suero de estradiol y progesterona reducidos, en una manera dosis dependiente, y niveles de T elevados así como de LH. Por su parte la FSH también fue marcadamente elevada para las dos dosis más elevadas de LTZ.

Núñez, Jelovac, Macedo, Berrigan, Perkins, Hursting, Barreto y Brodie, (2004), compararon los efectos de tamoxifen y LTZ, sobre el crecimiento de tumores mamarios. Este modelo simula el cáncer de mama posmenopáusico en varios aspectos, incluyendo la ausencia de la función ovárica. Para ello emplearon células humanas cancerígenas dependientes de estrógenos, transferidas con el gen aromatasa e inoculadas en matrigel, implantadas subcutáneamente en ratones ovariectomizados, tratados con LTZ (10µg/día, s.c.) o tamoxifen (100 µg/día s.c.) por 7 semanas (Ambos compuestos se prepararon en hidroxipropilcelulosa al 0.3%). Encontraron que el crecimiento de los tumores fue inhibido por ambos tratamientos, sin embargo a diferencia del tratamiento con tamoxifen, el tratamiento con LTZ inhibió el crecimiento de tumores sin inducir hipertrofia uterina, proporcionando evidencia de que este fármaco es una alternativa segura y efectiva en el tratamiento de cáncer de mama. Estos hallazgos son consistentes con previos estudios en cuanto a que comparado con tamoxifen, LTZ requiere una dosis mucho menor para ejercer aún mejor efecto en la inhibición del crecimiento tumoral.

Long, Jelovac, Handratta, Thiantanawat, MacPherson, Ragaz, Goloubeva y Brodie (2004), para probar la eficacia del LTZ, así como su uso óptimo en el tratamiento de cáncer de mama, en comparación con tamoxifen, o la combinación de ambos, utilizaron ratones ovariectomizados, los cuales recibieron inoculaciones subcutáneas en 4 sitios de la solución preparada con células cancerígenas humanas. La dosis s.c. de LTZ fue de 10 µg/día, de 100µg de tamoxifen o vehículo (hidroxipropilcelulosa, 0.3%). Sus hallazgos demostraron lo siguiente, los tumores doblaron en tamaño en un promedio de 3-4 semanas en el grupo control, tardaron 16 semanas cuando recibieron Tamoxifen,

con el tratamiento de LTZ + tamoxifen, estos tumores tardaron de 17-18 semanas y al recibir solamente LTZ, los tumores tardaron 34 semanas en doblar su tamaño, indicando que el tratamiento con LTZ fue superior al tratamiento con tamoxifen solo o combinado. Estos hallazgos lo convierten el agente más potente de aquellos estudiados en modelos de roedores.

Bhatnagar, Brodie, Long, Evans y Miller (2001), mencionan que una característica importante del perfil farmacológico de los inhibidores de aromatasa es la habilidad que poseen de inhibir la aromatasa intracelular. Estos compuestos inhiben potentemente la producción periférica de estrógenos, así mismo inhiben la aromatasa intratumoral, previniendo que las células tumorales produzcan su propio estrógeno. Para estudiar la inhibición aromatasa intracelular, compararon la potencia de los inhibidores no esteroides: LTZ, anastrozol y fadrozol en una variedad de modelos endocrino celulares y sistemas de tumores que contenían aromatasa. Usaron fragmentos de tejido ovárico de hámster, fibroblastos de tejido adiposo de mama humana normal, y células cancerígenas transferidas con el gen aromatasa humano. Encontraron LTZ fue consistentemente 10-30 veces más potente que cualquier otro tratamiento inhibiendo intracelularmente a la enzima aromatasa, en los tres tejidos analizados.

Brodie, Lu, Liu y Long (1999), mencionan que después de la menopausia, la producción ovárica de estrógenos declina, y que la síntesis de estrógenos se incrementa en tejidos periféricos, concurrentemente con niveles circulantes usualmente bajos. Ellos desarrollaron un modelo aromatasa-intratumoral para simular el cáncer de mama de pacientes posmenopáusicas con tumores estrógeno-dependientes. Este modelo utiliza células cancerígenas de cáncer mamario estrógeno-dependiente transferido con el gen aromatasa, inoculado en matrigel s.c. dentro de ratones ovariectomizados. A través de este modelo investigaron los efectos sobre el crecimiento tumoral de los antiestrógenos tamoxifen (60 μ /día) y faslodex (70 μ g/semana), los inhibidores de aromatasa LTZ (10 μ /día) y anastrozol (5 μ g/día), solos y en combinación. Encontraron que ambos tratamiento fueron efectivos deteniendo el crecimiento tumoral, sin embargo reportan que LTZ fue significativamente más efectivo que cualquiera de los otros tratamientos.

Años más tarde, Brodie, Jelovac y Long (2003), usando el mismo modelo, estudiaron los efectos de los inhibidores de aromatasa: LTZ y anastrozol y de los antiestrógenos tamoxifen y fulvestrant in vivo. Encontraron que los inhibidores de aromatasa fueron más efectivos que tamoxifen y que además fueron más efectivos solos que cuando fueron combinados con antiestrógenos, además agregan que LTZ tuvo un efecto de mayor duración que el tamoxifen. La combinación LTZ + tamoxifen dio como resultado que los tumores doblaran en volumen en aproximadamente 22 semanas. Sin embargo los tumores de ratones tratados con LTZ doblaron en tamaño hasta las 35 semanas, demostrando que éste inhibidor de aromatasa es más efectivo y tienen una duración de respuesta mayor como agente solo que el tamoxifen o en combinación con éste último.

Un aspecto importante que se debe considerar en farmacología al emplear las diversas drogas es la diferencia de género en la farmacocinética de éstos compuestos. Liu, Xie, Zhong y Li (2000), estudiaron las diferencias de género en la farmacocinética de LTZ en la rata. Para ello determinaron la concentración plasmática y en tejido de este inhibidor, tras su administración i.g. (2mg/kg), así mismo recolectaron excreciones urinarias y heces de los sujetos para su análisis. Encontraron marcadas diferencias de género 6 hrs. después de la administración del fármaco, de esta manera, las concentraciones plasmáticas de LTZ en ratas macho fue significativamente menor que las encontradas en hembras. También en tejido las concentraciones de LTZ fueron significativamente mayores en las ratas hembras que en el tejido de los machos 24 hrs. después de la administración. Estos investigadores concluyen que existen marcadas diferencias de género en la farmacocinética de LTZ en ratas.

En un estudio realizado por Hasan et al. (2004), se muestra que la administración de un Inhibidor de la aromatasa puede causar fallo ovulatorio y ovarios poliquístico, por lo cual especulan que una sustancia que aumenta la actividad de la aromatasa, o un potente activador de la aromatasa pueden ser las drogas de elección en el SOP.

En esta misma línea de investigación, Manneras, Cajandre, Holmäng, Seleskovic, Listig, Lönn y Stener-Victorin (2007), publican que al aplicar LTZ en ratas prepúberes con la intención de activar receptores para andrógenos, se observa el desarrollo

posterior de ovarios poliquísticos y anovulatorios con cambios estructurales muy similares a los observados en humanos con síndrome de ovario poliquístico, lo cual sugiere que al menos en esta edad, los andrógenos por si mismos pueden producir ovario poliquístico.

2.10 CICLOS ENDOCRINOS

El sistema endocrino ejerce un efecto regulador sobre los ciclos de la reproducción, incluyendo el desarrollo de las gónadas, el periodo de madurez funcional y su posterior envejecimiento, así como el ciclo menstrual, y el periodo gestacional. El patrón cíclico del estro, que es el periodo durante el cual es posible el apareamiento fértil en los animales está regulado también por hormonas. Los estrógenos deben su nombre a la capacidad de provocar el ciclo estral en los mamíferos hembras.

2.11 CICLO ESTRAL DE LA RATA

En la rata el ciclo estral que resulta de los cambiantes niveles hormonales se acompaña de cambios citológicos y conductuales característicos de las diferentes fases estrales, cada una de las cuales tiene una distinta duración: el proestro dura de 12 a 14 horas, el estro de 25 a 27 horas, el metaestro de 6 a 8 horas y el diestro de 55 a 57 horas. Sumadas las horas de cada etapa dan un total de entre 4 y 5 días, correspondiente al ciclo estral completo. El término estro se define como el periodo propicio para la actividad sexual en la hembra; las conductas femeninas que lo caracterizan se dividen en tres componentes: atractividad, receptividad y proceptividad. Mediante lavados vaginales es posible obtener una muestra de las células que recubren la pared vaginal en la rata. A esto le llamamos monitoreo de frotis vaginales que nos permiten observar los cambios citológicos específicos del ciclo estral, y caracterizar a cada etapa: el proestro, que es la fase preovulatoria, se pueden detectar células epiteliales nucleadas agrupadas que aparecen en la cumbre del proestro mostrando un núcleo redondeado y fácilmente distinguible. Transcurridas las 14 horas del proestro, ya en la fase de estro, en la cual durante las dos primeras horas ocurre la ovulación, con una duración aproximada de 12 horas, se detecta una gran cantidad de células cornificadas que

carecen de núcleo observable y contienen un citoplasma altamente granuloso con forma irregular. La fase correspondiente al metaestro se caracteriza por la presencia de leucocitos, además de células cornificadas enucleadas. Durante el periodo de diestro, los leucocitos invaden el epitelio, siendo las células dominantes, además comienzan a aparecer células epiteliales nucleadas.

2.12 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS

Tanto en hombres como en mujeres, este eje es un sistema hormonal que controla la liberación de hormonas sexuales. En ambos géneros, el sistema es activado por la GnRH, esta última es un decapeptido sintetizado en unas 1000 a 3000 neuronas ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal, desde donde es transportada a través de los axones de éstas neuronas hacia la eminencia media en donde vierten su secreción sobre los capilares portales fenestrados. La GnRH es liberada regularmente por pulsos cortos provenientes del hipotálamo. El hipotálamo puede dividirse a grosso modo en las regiones medial, periventricular y lateral, siendo la región medial la que contiene la mayor parte de los núcleos hipotalámicos, incluyendo al supraóptico, paraventricular, ventromedial y supraquiasmático. Bordeando al tercer ventrículo se encuentran los núcleos periventricular y arcuato. El último de estos núcleos hipotalámicos, es una banda de células que se extiende a través del hipotálamo a ambos lados del tercer ventrículo y que en la rata tiene aproximadamente 2mm. de extensión, el cual posee una extensa variedad de neurotransmisores y neuropéptidos que incluyen a la dopamina, GABA, Acetilcolina, hormona adrenocorticotropa, encefalinas, neuropéptido Y, somatostatina, hormona liberadora de gonadotropinas, tirosina hidroxilasa, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, prolactina y neurotensina. (Luquín, 1995).

El hecho de que las neuronas de éste núcleo proyectan axones sobre la eminencia media, lo convierte en un centro clave para la regulación neuroendocrina, y en una parte esencial en el control de la liberación cíclica de gonadotropinas. Además de esas proyecciones, el arcuato envía proyecciones hacia el hipotálamo lateral, anterior,

núcleo ventromedial y área preóptica, y las recibe del área preóptica ventromedial y posiblemente de otras varias regiones hipotalámicas. Knobil, Plant, Wildt, Belchetz y Marshall (1980), le dieron al núcleo arcuato el nombre de generador de pulsos, debido a que la síntesis hipotalámica de GnRH se realiza en forma de descargas agudas, rítmicas y de corta duración. Diversos estudios indican que para que haya una liberación de gonadotropinas controlada, es necesario que el núcleo arcuato se mantenga intacto, ya que la pérdida del ciclo estral y estro vaginal constante provocados por manipulación experimental con estradiol o la exposición a iluminación constante, en roedores, se acompañan por cambios citohistológicos en el núcleo arcuato del hipotálamo.

Además las neuronas del núcleo arcuato, que producen GnRH, reciben inervación proveniente de otros lugares del SNC, por la cual les llegan diferentes estímulos que frenen o aceleran su producción, los cuales pueden ser olfatorios, visuales y emocionales, por lo tanto la activación del generador de pulsos está sujeta a neuromodulación por parte de neurotransmisores con acción tanto estimuladora como inhibitoria. El generador de pulsos también puede ser influenciado a través de los esteroides ováricos. En el caso particular de la hembra, la GnRH es transportada por la red de vasos portales hacia la hipófisis, donde estimula la síntesis de las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) que tienen como órgano blanco a los ovarios. Éstos sincronizan la foliculogénesis, la ovulación y la síntesis de las hormonas sexuales, las que, a su vez, son capaces de desencadenar un mecanismo de retroalimentación sobre el hipotálamo y la hipófisis.

Smith y Jenness (2001), indican que la producción de GnRH es la señal cerebral primaria responsable de la liberación de LH y FSH de la glándula pituitaria anterior. La principal función de estas hormonas es inducir la producción de estrógenos en el ovario. La hormona esteroide ovárica estradiol retroalimenta tanto al sistema nervioso central como a la pituitaria anterior para regular los modelos de liberación de GnRH y de gonadotropinas, como la FSH y la LH (sintetizadas en un área de la hipófisis denominada gonadotropo). El receptor de la GnRH es una glucoproteína que se encuentra ubicado en la superficie de la membrana plasmática de células del

gonadotropo, y una vez que la GnRH se ha unido a su receptor, desencadena una serie de acciones que dan como resultados la secreción de LH y FSH. En el presente trabajo es de particular importancia examinar el papel de los péptidos opioides endógenos como componentes del circuito neural que regula la secreción de GnRH. Éstos péptidos constituyen un componente inhibitorio importante de la circuitrería que regulan la secreción de GnRH; un decremento significativo en el tono opioide inhibitorio es crítico para la generación de LH (Kalra, 1993); existe evidencia que apoya el papel de las β -endorfinas actuando a través de receptores opioides μ en la transmisión de la información a cerca del entorno esteroideal hacia neuronas GnRH. Las terminales nerviosas que contienen β -endorfinas, hacen sinapsis sobre el soma y dentritas de neuronas GnRH en la rata. Sin embargo, el RNAm de los tres tipos de receptores opioides, no ha sido encontrado en neuronas GnRH (Mitchell, Prevot, Jennes, Aubert, Croix y Beauvillain, 1997). No obstante los receptores opioides están presentes en muchas células dentro del área preóptica y del hipotálamo, lo cual indica que las β -endorfinas podrían influir en neuronas GnRH a través de la inhibición de interneuronas. La administración de β -endorfinas en hipotálamos aislados y en mujeres, provoca la supresión de los pulsos GnRH y LH, contrariamente, la aplicación de antagonistas opioides, induce un aumento de la amplitud y la frecuencia de los pulsos GnRH y LH. En conclusión, el fundamento del control hipotalámico sobre la función del ciclo estral reside en los cambios de amplitud y frecuencia de la secreción pulsátil de GnRH en la circulación portal, durante las distintas fases del ciclo.

2.13 VALERATO DE ESTRADIOL Y EFECTOS SOBRE EL HIPOTÁLAMO

Brawer, Naftolin, Martin y Sonnenschein (1978), sostienen que la administración de estrógenos a ratas hembras que presentan una ciclicidad normal, induce una degeneración neuronal acompañada generalmente por hiperactividad astrocítica y microglial en el núcleo arcuato hipotalámico. De hecho, ratas hembras jóvenes tratadas con estrógenos exhiben un síndrome anovulatorio caracterizado por cornificación vaginal persistente y el desarrollo de ovarios poliquísticos, estas características paralelas sugieren que el tratamiento con estrógenos podría acelerar el envejecimiento del hipotálamo reproductivo. Por su parte es aceptado desde hace mucho tiempo que las

hormonas ováricas también juegan un importante papel en el envejecimiento reproductivo normal en roedores.

Schipper, Brawer, Nelson, Felicio y Finch (1981), al realizar su estudio e interesados por el papel de las gónadas en el envejecimiento histológico del núcleo arcuato hipotalámico, sostienen que la actividad glial y astrocítica se incrementa marcadamente desde los 6 hasta los 14 meses de edad en roedores intactos, y que estos índices son muestra de un envejecimiento histológico de dicho núcleo, durante éste intervalo. La ovariectomía previno el desarrollo de la hiperactividad glial en el NA relacionada con la edad, indicando que al menos algunos aspectos del deterioro característico del envejecimiento en el núcleo arcuato son producto ovárico-dependientes. Este autor difiere de otros en la suposición de que la alta concentración de receptores E2 presentes en células del NA en la rata, podría en parte relacionarse con la especificidad anatómica de la lesión. La pérdida de la ciclicidad, relacionada con la edad es posiblemente un proceso multifactorial que involucra muchos componentes del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas. Los cambios histológicos observados en células gliales del núcleo arcuato de ratas envejecidas, se asocian con degeneración neuronal.

Brawer et al. 1978, demostró la aparición de una lesión similar en el arcuato en ratas jóvenes las cuales entraron en estro persistente tras la administración de una sola inyección de VE (2mg), y la lesión a dicho núcleo se piensa que representa una deaferentación química de éste núcleo con el APM, ya que 1) déficits reproductivos idénticos ocurren tras una desconexión quirúrgica del arcuato con el APM, y 2) la degeneración dentro del NA de ratas tratadas con VE involucra terminales axónicas y dendritas. Los resultados del presente estudio son consistentes con la hipótesis de que un producto ovárico contribuye a la disfunción hipotalámica de ratas acíclicas a través de la producción de una deaferentación química del núcleo arcuato hipotalámico.

El VE es una preparación que libera estradiol por un periodo aproximado de 12 a 20 días y que cuando se administra como dosis única (2 mg) a ratas hembras con ovarios intactos provoca estro persistente asociado con ovarios poliquísticos y paralelamente una lesión histológica identificable en el núcleo arcuato hipotalámico, concretamente

disminuyen de forma significativa las concentraciones de β -endorfinas, a los 60 días de que se administra.

Brawer et al. (1978) con el fin de estudiar los efectos de una sola inyección de VE sobre el núcleo arcuato hipotalámico y sobre la función reproductiva en la rata hembra, trabajó con ratas hembras Wistar sexualmente maduras, a las cuales les administró una sola dosis de VE (2 mg en 0.2 ml de aceite de sésamo s.c.) o vehículo. Realizaron observaciones endocrino y neurocitológicas, en varios periodos tras la aplicación de la inyección, para lo cual sacrificaron al menos a 2 sujetos de cada grupo de la siguiente manera: 1 día, 1 semana, 1 mes, 2 meses, 3, 4 y 6 meses. Los resultados obtenidos señalaron la iniciación y progreso de cambios patológicos en el núcleo arcuato del hipotálamo ya que, los astrocitos exhibieron una variedad de cambios citológicos incluyendo depósitos lipídicos densos y acumulaciones de filamentos gliales, así mismo, las células microgliales se mostraron más numerosas, con mayor actividad y se caracterizaron por inclusiones extremadamente densas y grandes. Por su parte las terminales axónicas también mostraron degeneración en este núcleo. Algunas neuronas mostraron contener grandes cantidades de lipofusina. La patología descrita fue mayormente concentrada en la región baso-lateral de la línea media del núcleo arcuato posterior, quedando así, prácticamente intactas las regiones ventromedial, dorsomedial y el núcleo periventricular anterior de dichos sujetos. Por su parte la mayoría de los sujetos experimentales exhibieron estro vaginal persistente a partir de las 6 semanas post-inyección, así como ovarios poliquísticos pequeños, que contenían folículos pobremente desarrollados y sin cuerpos lúteos.

Al medir las concentraciones plasmáticas de LH y FSH, no se encontraron diferencias significativas. De la misma manera al examinar PRL tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos. Las concentraciones plasmáticas de GH a las 12 semanas post-VE fueron significativamente altas con respecto a las concentraciones de los grupos control. En cuanto a los estrógenos circulantes, a las dos semanas de recibir la dosis única de VE, la concentración plasmática de 17β -estradiol fue extremadamente elevada, misma que tendió a declinar en las 6 semanas posteriores a la administración de dicha preparación. Estas primeras evidencias mostraron claramente el comienzo y progreso temporal de la lesión en el núcleo arcuato del hipotálamo que es posible

inducir tras la aplicación de una sola dosis de VE a ratas hembras con ovarios intactos. Previamente se ha especulado que el estradiol o uno de sus metabolitos sean directamente responsables de los cambios patológicos en dicho núcleo, ya que el estradiol medido en plasma es producido por los ovarios.

Desjardins, Brawer y Beaudet 1993, examinaron los efectos neurotóxicos del estradiol sobre neuronas del núcleo arcuato hipotalámico en un modelo de estrogenización crónica inducido por una sola inyección de VE. Encontraron que 8 semanas tras la administración de dicha preparación, las neuronas inmunoreactivas β -endorfinérgicas detectadas en el NA, habían disminuido en un 60 %, y en contraste el número de neuronas inmunoreactivas de neurotensina, somatostatina y TH no habían sufrido ningún cambio, sugiriendo que los efectos del estradiol fueron selectivos para neuronas β -endorfinérgicas. Mayor evidencia acerca de la selectividad de la acción del estradiol fue arrojada por RIA, indicando decrementos en concentraciones de β -endorfinas hipotalámicas, pero no en concentraciones de neuropéptido Y o en Met-enkefalina. En los sujetos controles, se observó abundancia en neuronas inmunoreactivas para β -endorfinas, distribuidas dentro del núcleo arcuato hipotalámico, en contraste, los sujetos tratados con VE, exhibieron un número considerablemente menor de células activas inmunoreactivas a β -endorfinas; además las pocas neuronas inmunopositivas detectadas eran pequeñas y secas (exprimidas), y mostraron dendritas deformes e infladas, indicativo de degeneración. Los decrementos en el número de neuronas inmunoreactivas para β -endorfinas, así como en las concentraciones hipotalámicas observados tras el tratamiento con VE reflejan pérdida celular real y no reducciones en la expresión del péptido, demostrando así que la lesión inducida por el Ve es progresiva. Esto indica que el efecto neurotóxico selectivo del estradiol sobre neuronas β -endorfinérgicas contribuye a la senectud reproductiva, sugiriendo que los esteroides pueden participar en la ruptura de las funciones biológicas que ellos normalmente facilitan.

Dado que todas las proyecciones endorfinicas en el SNC, tienen su origen dentro del NAH, los sujetos tratados con VE podrían servir como un excelente modelo para examinar los efectos de la depleción selectiva de las β -endorfinas.

El mecanismo subyacente al efecto patógeno del estradiol sobre células β -endorfinérgicas hipotalámicas es desconocido. Una única característica del núcleo arcuato podría relacionarse con su susceptibilidad hacia la neurotoxicidad por el estradiol, y es la presencia inusual de astrocitos peroxidasa positiva que son altamente sensibles a los niveles de estradiol circulante (Brawer et al. 1978; Schipper, Lechan y Reichlin (1990). Estos astrocitos identificados tanto en el cerebro de la rata como en el humano, pueden transformar catecol-estrógenos, generados espontáneamente en el cerebro a partir del estradiol circulante, a radicales libres o-semiquinona (Schipper, Mateescu-Cantuniari, 1991). Éstos radicales libres podrían, a su vez, causar peroxidación lipídica de la membrana neuronal y eventualmente provocar muerte celular. Apoyando el papel de los radicales libres en el modelo de estrogenización crónica a través de una sola dosis de VE, algunos estudios han demostrado que el tratamiento con vitamina E (un potente antioxidante), previene la pérdida de β -endorfinas inducida por el VE (Desjardins, Beaudet, Schipper, y Brawer, 1992).

La vulnerabilidad única de neuronas β -endorfinérgicas podría ser el resultado de una variedad de factores, incluyendo una insuficiencia selectiva en la enzimas recolectoras de radicales libres o una proximidad única a astrocitos peroxidasa positivos generadores de radicales libres. Estos hallazgos contribuyen a fortalecer la idea de que además de sus papeles fisiológicos bien establecidos, los esteroides, actúan como neurotoxinas selectivas.

Desjardins et al. (1992), tomando en cuenta que el tratamiento con VE da como resultado la destrucción del 60% de neuronas β -endorfinérgicas del NAH, y que el mecanismo sugerido para que esta preparación induzca la neurotoxicidad involucra la conversión de estradiol a catecol-estrógeno y la subsecuente oxidación a radicales libres en astrocitos peroxidasa positivos locales, examinó si el tratamiento con el antioxidante vitamina E, protegía a neuronas β -endorfinérgicas de la acción neurotóxica del estradiol.

Los sujetos tratados con VE mostraron reducciones significativas en las concentraciones de β -endorfinas hipotalámicas, consistente con pérdida de células; en

contraste, animales tratados concomitantemente con VE y vitamina E, presentaron niveles de β -endorfinas comparables con los sujetos controles. Por su parte los sujetos tratados solamente con vitamina E, mostraron concentraciones de β -endorfinas que fueron significativamente mayores que las de sujetos controles. Así mismo fueron evidentes los efectos del VE sobre ovarios al desencadenar ovarios poliquísticos y estro vaginal constante en sujetos tratados solo con VE, en contraste los sujetos tratados con VE+vitamina E tuvieron ovarios menos dañados y una ciclos estrales normales. Los resultados de estos autores demuestran que el tratamiento crónico con vitamina E, previene el decremento en las concentraciones de β -endorfinas hipotalámicas resultante de la pérdida de células β -endorfinérgicas del núcleo arcuato, sugiriendo que dicha pérdida es mediada por los radicales libres. Así mismo el tratamiento con este antioxidante previno la aparición de cornificación vaginal persistente y ovarios poliquísticos, condición resultante de la patología hipotalámica inducida por el VE. La prevención de los efectos degenerativos del estradiol por el tratamiento con vitamina E, apoya la hipótesis de que la neurotoxicidad del estradiol es mediada a través la peroxidación lipídica inducida por radicales libres.

Stener y Lindholm (2004), estudiaron si ratas con ovario poliquístico inducido vía VE, presentan concentraciones alteradas de b-endorfinas a nivel hipotalámico y en plasma, y si estos sujetos, desarrollan alteraciones en la actividad y concentraciones de células inmunológicas. Este grupo introduce 12 sesiones de 25 min. de electro acupuntura (EA) 2-3 días post-VE con la expectativa de que dicho tratamiento modulara la liberación de b-endorfinas, la respuesta inmune y la actividad del sistema nervioso autónomo. Dichas variables mostraron concentraciones significativamente menores en ratas tratadas con VE que ratas control tratadas con aceite, y el tratamiento con EA en ratas tratadas con VE incrementó significativamente las concentraciones hipotalámicas de b-endorfinas. Concluyen que el sistema opioide en conjunto con el sistema inmune se encuentran significativamente alterados en ratas con ovario poliquístico y que el tratamiento con EA puede restaurar algunos de estos disturbios.

2.14 CIRCUITOS NEURONALES AFECTADOS POR LA TOXICIDAD DEL VE

El estradiol proporciona señales fisiológicas hacia el cerebro a lo largo de la vida, que son indispensables para el desarrollo y regulación de la función reproductiva. Además de sus múltiples acciones fisiológicas, diversos estudios han mostrado que el estradiol es selectivamente citotóxico para neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico. El mecanismo subyacente a esta acción neurotóxica parece involucrar la conversión de estradiol a catecol estrógeno y la subsecuente oxidación a radicales libres o-semiquinona.

La pérdida de neuronas β -endorfinérgicas inducida por el estradiol provoca un incremento compensatorio en ligandos opioides μ en el área preóptica medial volviendo a ésta área supersensible a residuos de β -endorfinas o a otros opioides endógenos. El estradiol ejerce un efecto patológico específico sobre el hipotálamo que podría contribuir a una variedad de desórdenes reproductivos femeninos con un componente hipotalámico significativo.

Actualmente se ha logrado correlacionar la disfunción del hipotálamo ovario-dependiente, con la lesión inducida por el VE en el núcleo arcuato hipotalámico, el cual contiene células nerviosas que proyectan al área preóptica medial, y en dicha área se localizan la mayor parte de células GnRH. Muchas de las aferencias que provienen del arcuato parecen contribuir a la regulación de LH, influyendo de manera directa o indirecta sobre el sistema de neuronas GnRH (Brawer, Beaudet, Desjardins y Schipper, 1993), algunos de éstos inputs, como aquellos que liberan NPY o neurotensina, son excitatorios, mientras que los inputs que contienen β -endorfinas son inhibitorios (Kalra, Allen, Sahu y Crowley, 1988). Aunque la población neuronal es densamente entremezclada en el núcleo arcuato, la acción patológica del estradiol parece ser selectiva para neuronas β -endorfinérgicas.

Desjardins et al. (1993), indica que tras 8 semanas de tratamiento con VE, la concentración hipotalámica de β -endorfinas y el número de neuronas inmunoreactivas β -endorfinérgicas en el núcleo arcuato son reducidas en un 60%. En contraste, el tratamiento con VE no tiene efecto sobre neuronas inmunoreactivas para neurotensina,

somatostatina o tirosina hidroxilasa. De la misma manera dicho tratamiento parece no afectar las concentraciones hipotalámicas de Met-enkefalina o neuropéptido Y. Cuantitativa y morfológicamente el remanente de neuronas β -endorfinérgicas indica que hay numerosos disturbios a nivel de procesos dendríticos y de soma inmunoreactivo, y por ende se infiere que las células que aún sobreviven están en proceso de degeneración (Brawer et al. 1993).

La beta-endorfina es un poderoso inhibidor de la liberación de LH. La pérdida selectiva aferentes β -endorfinicos que llegan al área preóptica medial, produciría un incremento en la secreción de LH hipofisiaria y paradójicamente ocurre lo contrario, ya que la destrucción de neuronas β -endorfinérgicas inducida por el VE coincide con una marcada supresión del modelo de plasma de LH (Brawer et al. 1993; Desjardins, Beaudet y Brawer, 1990). Una explicación para esta incongruencia involucra una respuesta específica de las células diana β -endorfinérgicas en el área preóptica medial hacia la pérdida de aferentes de β -endorfinas. Cuando estudiaron esta respuesta a través de autoradiografía, usaron ligandos opioides específicos y demostraron que este incremento se debió a un incremento selectivo en ligandos μ -opioides y que esto ocurrió en la región del área preóptica medial densamente poblada con neuronas GnRH, sugiriendo que los elementos diana para β -endorfinas en el APM, posiblemente las células GnRH, exhiben una sobre-regulación compensatoria de sitios de ligandos μ en respuesta a la deaferentación parcial. Esto podría volver a estas células supersensibles a residuales de β -endorfinas o hacia otros ligandos μ endógenos como la Met-enkefalina. Así, la inhibición opioide crónica resultante podría relacionarse con el modelo suprimido en plasma de LH, característico de las ratas tratadas con VE.

2.15 MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ESTRADIOL

Hasta ahora no se ha logrado establecer claramente cómo y porqué el estrógeno es selectivamente patógeno al núcleo arcuato del hipotálamo, ya que algunas células diana para estradiol en dicho núcleo, como aquellas que expresan TH o Met-enkefalina, permanecen exentas de la lesión, lo cual hace improbable que el daño neuronal esté directamente mediado por una interacción convencional receptor-E2. Más aún, otros

núcleos hipotalámicos, ricos en receptores para E2 y/o aferentes de neuronas receptoras de E2, no exhiben esta respuesta patológica para el estradiol (Brawer, Schipper y Naftolin, 1980; Brawer et al. 1978).

Schipper et al. (1991), estudió la toxicidad causada por estrógenos, por medio de un modelo realizado en cultivos celulares en la única población de astrocitos periventriculares del núcleo arcuato, que contienen gran cantidad de inclusiones de glía Gomori-positiva, las cuales mostraron actividad no-enzimática de una enzima, la peroxidasa positiva, utilizando DAB (diaminobenzidina) fué posible marcar éstas inclusiones. El tratamiento con VE incrementa ampliamente el número y tamaño de éstas inclusiones. Tras este estudio es posible inferir que la actividad de peroxidación al catalizar la formación de radicales libres citotóxicos, podría mediar el efecto patológico que el E2 ejerce en el núcleo arcuato hipotalámico.

El estudio de otras sustancias citotóxicas en neuronas beta-endorfinérgicas, pueden ayudarnos a entender los mecanismos a través de los cuales estas neuronas pueden ser afectadas. Chen, Kuhn, Chaturvedi, Boyadjieva y Sarkar (2006), estudiaron el mecanismo por el cual el etanol induce muerte de neuronas beta-endorfinérgicas en periodos del desarrollo, y para ello emplearon células hipotalámicas de fetos de rata en cultivos primarios, encontrando que la adición de etanol a estos cultivos estimuló la muerte celular apoptótica de estas neuronas a través del incremento en la actividad de la proteína caspasa-3. Además encuentran que el etanol decrementó los niveles de RNAm de la adenilil ciclasa (AC)7, de la AC8, y el AMPc en células hipotalámicas. También encuentran que un análogo del AMPc bloqueó la acción apoptótica del etanol sobre estas neuronas, y que un inhibidor de la AC (la dideoxiadenosina-DDA) incrementó la apoptosis celular reduciendo el número de neuronas b-endorfinérgicas. Adicionalmente estas neuronas mostraron inmuno reactividad a la proteína transformadora del factor de crecimiento beta-1 (TGF-beta-1) y tanto el etanol como la DDA incrementan su producción o liberación por células del hipotálamo. Por su parte un análogo del AMPc es capaz de bloquear la activación que induce el etanol del TGF-beta-1. Estos hallazgos los llevan a determinar que la administración de etanol altera la expresión de genes que regulan la apoptosis celular de estas neuronas. Por ende la muerte celular inducida por etanol involucra al menos en parte la supresión de la

producción de AMPc y la activación del TGF-beta-1, que señala los procesos apoptóticos.

2.16 SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS COMO MECANISMO MEDIADOR EN EL PROCESO DE CITOTOXICIDAD POR VE

Este síndrome afecta al 4% de las mujeres en edad reproductiva y se caracteriza por anovulación crónica e hiperandrogenismo y es actualmente la causa más común de infertilidad. Concretamente el SOP es causado por un desvalance en las hormonas cerebrales y las del ovario. La glándula pituitaria produce a las hormonas LH y FSH, las cuales envían señales a los ovarios para que produzcan estrógenos y progesterona, así mismo el ovario produce andrógenos en proporciones pequeñas, principalmente testosterona. El SOP ocurre cuando entre estas hormonas no hay una adecuada comunicación, y específicamente la pituitaria produce demasiada LH, causando que los ovarios produzcan testosterona extra. Wood, Nelson, Ho, Jansen, Wang, Urbanek, McAllister, Mosselman y Strauss III., (2003), reportan que el sello distintivo en el SOP corresponde a una secreción de andrógenos excesiva por las células de la teca, lo cual esta directamente ligado a los síntomas que se observan durante esta condición.

Los hallazgos de laboratorio más frecuentes son: aumento de la LH, aumento de la relación LH/FSH, aumento de andrógenos y de estrógenos circulantes, los ovarios presentan acumulación de folículos inmaduros, además tienen un tamaño de dos a cinco veces mayor que los ovarios normales y presentan una cubierta externa blanca, gruesa y muy resistente. El uso de estrógenos de depósito es útil para la producción del síndrome de ovarios poliquísticos en animales de experimentación (Méndez, Barrón, Hernández y Kably, 1997).

Paredes, Galvez, Leyton, Aravena, Fiedler, Bustamante y Lara, (1998) mencionan que la activación de la inervación simpática es un evento que precede a la inducción de ovarios poliquísticos en ratas a las cuales les es aplicado VE, por lo tanto el mecanismo de inducción a través de VE podría involucrar componentes directos y neurogénicos. Para probar esta hipótesis, usaron un tipo de estrés combinado para inducir un

incremento en el tono simpático, incluyendo aquel de los nervios simpáticos ováricos. Ellos encuentran que tres semanas después de comenzar con el estrés, se incrementó el contenido de norepinefrina (NA) en el ganglio celíaco, se incrementó también la liberación de NA por el ovario, no se registro cambio en la recaptura de NA por el ovario y tampoco hubo cambios en el contenido en ovario de este neurotransmisor. Por su parte se observó un decremento significativo en el contenido ovárico de neuropéptido Y. Sugiriendo que la síntesis de NA y su secreción están incrementadas durante este periodo, y se correlacionan con el incremento en la secreción de andrógenos y estradiol, el desarrollo de folículos prequísticos, y un decremento en la proporción ovulatoria. Estos resultados sugieren la participación de un factor extraovárico que puede actuar localmente para controlar la liberación de NA desde el ovario, y apoyan la hipótesis de que una actividad simpática incrementada, juega un papel clave en el desarrollo y mantenimiento de quistes ováricos.

Otro estudio importante es el realizado por Luza, Lizama, Burgos, y Lara (1995), en el cual ponen de manifiesto que ovarios poliquísticos, así como anovulación crónica, se puede inducir por una sola dosis de VE (2mg, i.m.) en la rata. Además mencionan que la exposición constante a altos niveles plasmáticos de estradiol provoca un efecto neurotóxico sobre neuronas hipotalámicas, incluyendo a las neuronas del núcleo arcuato. Dada la importante participación de la NA hipotalámica en la regulación de la liberación de GnRH y los posibles efectos nocivos de una exposición prolongada de estas neuronas al estradiol, ellos se interesaron en estudiar la actividad de neuronas noradrenérgicas que inervan al hipotálamo, para ello analizaron la biosíntesis, contenido y liberación de NA provenientes de terminales nerviosas noradrenérgicas del hipotálamo durante la condición de ovarios poliquísticos. Los hallazgos revelan que la liberación de NA del hipotálamo anterior, inducida eléctricamente, estuvo incrementada durante la condición de ovarios poliquísticos provocada por el VE y se decrementó en hipotálamo medial, así mismo, estos autores encontraron un decremento en el contenido de dopamina en hipotálamo anterior. Además es interesante que las observaciones del presente estudio, consistentes en cambios en la actividad neural de neuronas NA, se correlaciona con mucha evidencia obtenida de pacientes humanos con

SOP, la cual sugiere fuertemente un tono noradrenérgico hipotalámico incrementado y una actividad dopaminérgica decrementada.

Barria, Leyton, Ojeda y Lara (1993), comentan que la inducción del SOP en roedores, a través de la administración de una sola dosis de VE, da como resultado una activación de neuronas simpáticas periféricas que inervan al ovario, la cual es evidenciada por una capacidad incrementada de las terminales nerviosas ováricas para incorporar y liberar NA, un incremento en el contenido ovárico de NA y un decremento en el número del receptor ovárico beta-adrenérgico en los compartimentos ováricos que reciben inervación catecolaminérgica. Estos investigadores se interesaron por determinar las consecuencias funcionales de esta salida simpática incrementada hacia el ovario. Las ratas tratadas con VE exhibieron un incremento marcado en las respuestas de la progesterona ovárica y andrógenos hacia un agonista de receptores beta-adrenérgicos. Estos autores indican que la transección del nervio superior ovárico, el cual lleva muchas de las fibras catecolaminérgicas que inervan a células ováricas, reduce dramáticamente las respuestas exageradas de los esteroides gonadales hacia la estimulación beta-adrenérgica y de gonadotropinas, también esta técnica reduce los elevados niveles de NA ovárica resultante del tratamiento con VE y causa sobrerregulación de los adrenorreceptores beta; de mayor importancia aún, es el que esta transección del nervio superior ovárico restauró la ciclicidad estral y la capacidad ovulatoria. Los resultados indican que la salida incrementada de esteroides ováricos en la condición de ovarios poliquísticos es debida, al menos parcialmente, a una responsividad incrementada de la glándula hacia estimulación catecolaminérgica y de gonadotropinas. El hecho de que la transección del nervio superior ovárico restaure una respuesta normal indica, que la alteración de la salida de esteroides, es el resultado de un desarreglo en la activación de componentes selectivos de la inervación noradrenérgica al ovario. Estos hallazgos apoyan el concepto de que una alteración en el control neurogénico del ovario contribuye a la etiología de ovarios poliquísticos.

Lara, Ferruz, Luza, Bustamante, Borges y Ojeda (1993) señalan que en roedores se puede inducir experimentalmente una condición similar a la del SOP, inyectando una sola dosis de VE, y empleando este modelo examinaron la posibilidad de que esta

condición se asocie con una descomposición en el control del ovario. Sus resultados confirman que existe una relación entre la activación precedente de neuronas simpáticas que inervan al ovario y el desarrollo de ovarios poliquísticos, y aumentan la posibilidad de que una descomposición de las entradas simpáticas hacia el ovario contribuye a la etiología del SOP.

Posteriormente Lara, Dissen, Leyton, Paredes, Fuenzalida, Fiedler y Ojeda (2000), realizaron otro estudio para probar la hipótesis de que el cambio en el tono simpático se relaciona con una producción aumentada del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y que esta producción anormalmente elevada de dicho factor, contribuye a la formación de quistes ováricos inducidos por el VE. Encontraron que la inyección del esteroide dio como resultado una incrementada síntesis intraovárica del NGF y su baja afinidad hacia el receptor P75NGFR. El incremento fue máximo 30 días tras el VE, coincidiendo con la elevación en el tono simpático al ovario y precediendo la aparición de quistes foliculares. Sus resultados indicaron que la hiperactivación de los nervios simpáticos ováricos vista en los ovarios poliquísticos inducidos por el VE está relacionada con una sobreproducción de NGF y su baja afinidad receptora en la glándula.

Carriere, Farookhi y Brawer (1989) enfatizan que el tratamiento a ratas hembras con VE provoca un daño hipotalámico que resulta en una aciclicidad anovulatoria y ovarios poliquísticos. Así mismo sostiene que el daño hipotalámico compromete a la regulación del sistema opioide endógeno, generando una supresión opioidérgica en la secreción de GnRH, la cual es subsecuentemente reflejada en un contenido hipofisiario crónicamente bajo de receptores de GnRH. Hipotetizando que esto sucedía, ellos sugirieron que la inhibición de la transmisión opioidérgica podría incrementar el modelo GnRH y daría como resultado un incremento en el contenido hipofisiario de receptores de GnRH y una mejora de la condición de ovarios poliquísticos. Ellos trataron a ratas con ovarios poliquísticos, con inyecciones diarias de naltrexona y observaron que en la primera semana hubo un incremento significativo en dichos receptores y una mejoría marcada en la morfología ovárica, indicando que el sistema opioidérgico hipotalámico está crónicamente activo, y contribuye significativamente al desarrollo de la condición de ovarios poliquísticos.

Dissen, Lara, Leyton, Paredes, Hill, Costa, Martinez Serrano y Ojeda (2000), apegados también al modelo de inducción de ovarios poliquísticos a través del VE, comentan que precediendo el desarrollo que quistes foliculares, existe un incremento en la síntesis intraovárica del factor de crecimiento nervioso (NGF) y una baja afinidad por su receptor (p75 NGFR); y que el bloqueo selectivo de las acciones del NGF y la síntesis de su receptor en el ovario, restaura la ciclicidad estral y la capacidad ovulatoria en ratas tratadas con VE, sugiriendo que el incremento en el NGF y las acciones mediadas por su receptor dentro del ovario contribuyen al desarrollo de quistes ováricos. Por tanto se deduce que una producción anormalmente elevada de NGF dentro del ovario basta para iniciar muchas de las alteraciones estructurales y funcionales asociadas con el desarrollo de quistes foliculares en el ovario de la rata.

2.17 RELACIÓN ENTRE EL DECREMENTO CENTRAL DE B-ENDORFINAS HIPOTALÁMICAS, CAUSADO POR EL VE, Y CONSUMO DE ALCOHOL

Diversos estudios a lo largo de la última década han pretendido correlacionar el decremento en concentraciones de β -endorfinas hipotalámicas con variaciones en consumo de alcohol en modelos experimentales, para lo cual han administrado dosis crónicas de VE (2 mg) a ratas hembras adultas que ciclan regularmente. El alcohol ejerce un amplio rango de efectos a través de su interacción con muchos neurotransmisores y neuromoduladores en el SNC. Entre éstos, parece ser que el sistema opioide endógeno, podría jugar un papel prominente en algunos de los efectos conductuales del etanol en roedores, así como en otros mamíferos. Son muchas las líneas de investigación que indican esta interacción.

El etanol modifica las propiedades de ligandos de receptores opioides así como la síntesis y secreción de opioides endógenos (De Waele et al. 1992; De Waele y Gianoulakis, 1993; Gianoulakis et al. 1989; Rasmussen, Bryant y Boldt, 1998). Una gran cantidad de estudios han mostrado que los antagonistas opioides reducen los efectos conductuales del etanol, así como el consumo voluntario o la actividad locomotora inducida por esta droga (Davidson y Amit, 1997). Recíprocamente, otros autores han reportado que dosis bajas de agonistas opioides, especialmente ligandos de

receptores opioides μ , pueden incrementar algunos de estos efectos del etanol (Hubbell, Czirr y Reid, 1987). Un gran número de estudios en roedores y en humanos revelan que los sujetos con alta sensibilidad del sistema opioide endógeno al etanol, presentan alto riesgo para consumir excesivamente etanol, más que aquellos sujetos con baja sensibilidad al etanol (Gianoulakis, 1996).

Tres familias de péptidos opioides se han caracterizado como derivados de tres distintas proteínas precursoras de alto peso molecular, parece que los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina, la β -endorfina, puede ser particularmente significativa para explicar las interacciones opioides endógenos-alcohol. Los sitios cerebrales de síntesis de POMC incluyen al núcleo arcuato hipotalámico y al núcleo del tracto solitario. Las neuronas POMC del núcleo arcuato presentan proyecciones extensivas, incluyendo proyecciones rostrales al diencefalo periventricular, telencéfalo y muchos otros núcleos hipotalámicos (Tsou, Khachaturian, Akil y Watson, 1986). Por consiguiente, la extensión y blancos de estas proyecciones, sugieren que el NAH es un sistema interesante para medir las interacciones entre alcohol y los péptidos POMC relacionados en el SNC.

Por otra parte se ha demostrado que una sola inyección de VE dada a roedores hembras causa una exposición ininterrumpida a concentraciones fisiológicas de estradiol producidas por los ovarios (Brawer et al. 1980). Esta exposición crónica, como resultado de la aplicación de VE, inicia una lesión progresiva a través del Núcleo arcuato Hipotalámico (NAH). Interesantemente este efecto neurotóxico es restringido a neuronas que contienen POMC (Desjardins et al. 1993). Así, se ha reportado que 8 semanas después del tratamiento con VE se detecta un decremento del 60% en el número total de neuronas inmunoreactivas para β -endorfinas en el NAH, mientras que otras poblaciones neuronales no son afectadas. Estos hallazgos vuelven al VE una herramienta interesante para examinar el papel de las neuronas del NAH que contienen β -endorfinas en el amplio número de procesos fisiológicos en los cuales estos péptidos han sido involucrados, incluyendo su interacción putativa con el etanol.

Sanchis-Segura, Correa y Aragon (2000), teniendo en cuenta que el sistema opioide endógeno, especialmente las β -endorfinas, pueden jugar un papel clave en los efectos conductuales del etanol, y considerando los antecedentes de que una sola inyección de VE produce un efecto neurotóxico sobre la población de neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico, se propusieron revelar el papel de neuronas del NAH que contienen β -endorfinas, en algunos efectos conductuales del etanol, usando VE. Y para dar respuesta a esta pregunta realizó el siguiente estudio. Ratonas hembras tratadas con inyecciones i.m. de VE (2mg), o vehículo, fueron sometidas a pruebas conductuales 8 semanas después de dicho tratamiento. Primero, en un intento por medir los efectos de este tratamiento sobre la actividad locomotora inducida por el etanol, estas ratonas fueron sometidas a inyecciones i.p de alcohol (0.0, 0.8, 1.6, 2.4 o 3.2 g/kg), sus resultados revelaron lo siguiente: la administración de VE no produjo ningún cambio en la actividad locomotora espontánea pero, recíprocamente, bloqueó la actividad locomotora inducida por dosis bajas (0.8 g/kg) y moderadas de etanol (1.6 o 2.4 g/kg). Este autor sugiere que las neuronas del NAH que contienen β -endorfinas, pueden jugar un importante papel en algunos, pero no en todos los efectos conductuales del etanol.

Reid, Marinelli, Shannon, Fiscale, Narciso, Oparowski, Reid., Merrigan, Moricone, Hubbel y Gianoulakis (2002) motivados por hallazgos previos en los cuales se confirma que una sola inyección de VE (un compuesto que libera estradiol de manera sostenida por 12 y no más de 20 días), produce daño selectivo a neuronas hipotalámicas secretoras de β -endorfinas, y considerando que este tratamiento se podrían emplear como modelo para medir el papel de las β -endorfinas en procesos relacionados con el abuso de alcohol o alcoholismo, realizaron una serie de experimentos. Para averiguar los efectos de una sola inyección de VE en ratas hembras, así como su relación con el consumo de etanol y concentraciones de β -endorfinas, emplearon soluciones que contenían variadas concentraciones de etanol y sacarina. Sus hallazgos sostienen que los sujetos a los cuales se les expuso al consumo voluntario de alcohol a los 3 días posteriores a la i.m. de VE, decrementaron dramáticamente el consumo de bebidas alcohólicas endulzadas, en los primeros días subsecuentes a la administración del VE y que entre la cuarta y quinta semana posteriores a la inyección de VE, los sujetos

retornaron a los niveles basales de consumo, mismos que se mantuvieron estables por mas de 39 días.

En cambio aquellos sujetos a los cuales se les expuso al consumo voluntario de alcohol, un mes después de la i.m. de VE, presentaron incrementos considerables en el consumo de alcohol. Por su parte, aunque las concentraciones de β -endorfinas no fueron significativamente menores que las de los sujetos controles, si mostraron una reducción. Los autores indicaron que los sujetos que fueron calificados como bebedores fuertes, presentaron niveles bajos de dicho péptido. Dado que hay variación en diversos reportes a cerca de las modificaciones que se observan sobre el consumo de alcohol, tras la aplicación de VE, es de gran importancia considerar las variaciones en la metodología, a la hora de elaborar el diseño experimental que se basa en el modelo de citotoxicidad inducida por el VE (específicamente el tiempo entre la inyección y la primera oportunidad para beber). Fue posible observar también un interesante modelo de cambios en el peso corporal de los sujetos tratados con VE, el cual consistió en una pérdida de peso inicial justo los primeros 15-21 días después de la inyección de VE, con una posterior recuperación inmediatamente después de este periodo, el cual coincide con el tiempo en el cual el VE ya no está liberando grandes cantidades de estradiol.

Además se podría deducir que mientras que la preparación de VE está liberando estradiol (12-20 días) los sujetos se someten a cambios abruptos en su organismo adaptándose a dosis suprafisiológicas de estradiol, provocados por la liberación de dicha hormona, y como consecuencia al malestar experimentado por dicho fenómeno, disminuyen el consumo. Una vez que cesa la liberación, y que ha ocurrido el daño, específicamente el decremento en neuronas β -endorfinérgicas, los sujetos retoman la conducta de ingesta y beben cantidades aún mayores que las registradas antes de la aplicación del VE. Reid et al. (2002) muestra que una sola inyección de VE (2mg) en ratas, modifica el consumo de bebidas alcohólicas, ya que mientras el estradiol está siendo liberado, el consumo de bebidas alcohólicas endulzadas, es reducido considerablemente. Cuando la liberación de estradiol, provocada por el VE finaliza, el consumo de bebidas alcohólicas endulzadas y no endulzadas se incrementa

significativamente y el efecto post-VE es marcadamente duradero, ya que sostienen consumos elevados de etanol por varios meses tras la inyección.

Algunos investigadores interesados en este modelo experimental, deciden presentar la bebida alcohólica al tiempo en que otros datos reportan que el apetito por bebidas alcohólicas ha iniciado, dicho periodo corresponde a 4 o 5 semanas post-VE. Reid, Hubbell y Reid (2003) realizaron otras investigaciones, con el fin de observar si se presentaban modificaciones en el consumo de bebidas alcohólicas preparadas con diversas concentraciones de sacarina, después de la aplicación de VE. En estos estudios también se emplearon ratas hembras, a las cuales les fue administrada la dosis farmacológica de VE (2 mg) o vehículo en el mismo volumen de dilución al grupo control. La dosis se administró 15 días previos a la primera exposición al etanol.

La primera exposición al consumo de etanol, se realizó con una bebida que contenía una concentración de 12% de etanol + 0.25% de sacarina, por un periodo de 25 días, durante los cuales los sujetos tuvieron agua y alimento ad libitum. Luego de estos primeros 25 días de exposición, hubo un segundo periodo de exposición de 3 semanas durante el cual se empezaron a reducir gradualmente las concentraciones de sacarina siendo de 0.125%, 0.0625% y 0% respectivamente. La etapa posterior a alcohol 12% + sacarina 0, los sujetos se expusieron al alcohol sin endulzar por 12 días más, el cual una vez terminado fue seguido por un periodo de abstinencia de 21 días. La última etapa del presente estudio correspondiente al periodo post-abstinencia, consistió en someter a los sujetos a etanol al 12% + 0.0625% de sacarina durante 3 días (es decir a los 94-96 días post-VE). En general pudo detectarse que el VE provoca realmente un aumento en la ingesta de bebidas alcohólicas, iniciando en la tercera semana y acentuándose en las semanas 4 y 5 post-VE.

Marinelli, Quirion y Gianoulakis (2003), en su trabajo experimental investigaron si el VE altera el consumo voluntario de alcohol en ratas Wistar y ratas Lewis, si el efecto del VE sobre el consumo está asociado con cambios en el contenido hipofisiario e hipotalámico de β -endorfinas y si las diferencias en el consumo de etanol entre tratamientos y entre grupos de ratas se asocian con conductas locomotora y defensiva,

así como con estados de ansiedad registrados a través de una escala. En el presente estudio emplearon 60 ratas hembras adultas, de las cuales la mitad eran de la línea Wistar y las 30 restantes fueron ratas Lewis, 15 sujetos de cada grupo recibieron una dosis farmacológica i.m. de VE (2 mg). El resto de los sujetos fueron tratados con vehículo (0.2 ml de aceite de sésamo). 8 semanas después del tratamiento con VE o vehículo, todos los sujetos fueron probados por 2 días consecutivos en un laberinto elevado en cruz y en el ensayo a campo abierto, y cada sujeto permaneció 5 minutos en cada prueba. En la semana nueve, 4-6 sujetos de cada línea y de cada uno de los 4 grupos, fueron sacrificados, y se procedió a extraer el hipotálamo y los lóbulos anterior e intermedio hipofisarios, con el propósito de cuantificar β -endorfinas en ausencia de cualquier efecto ocasionado por el alcohol. Los sujetos restantes se expusieron al consumo voluntario de alcohol, el cual se evaluó en 2 fases. Primero, durante la fase de adquisición la cual tuvo una duración de 8 días, se expuso a los animales a concentraciones ascendentes de etanol: 2%, 4%, 6% y la concentración final de 8%. El día 9 luego de la primera exposición al alcohol, comenzó la segunda fase de exposición al consumo voluntario de etanol (etanol 8%) denominada fase de mantenimiento, la cual se extendió a 16 días.

Una vez concluida la fase de mantenimiento los sujetos se sacrificaron y se extrajeron las mismas áreas que aquellos sujetos a los cuales no se les expuso al etanol tras el tratamiento con VE y vehículo, con el mismo fin, cuantificar β -endorfinas. Los resultados demuestran que el VE ejerció un efecto mayor en el peso corporal de las ratas Wistar, (durante la mayor parte del periodo post-VE) comparado con el peso corporal de los grupos control, mientras que en las ratas Lewis el efecto del VE sobre esta misma variable, solo fue evidente sobre la quinta semana post-VE. El peso corporal de ambos grupos no se vio afectado mientras fueron expuestos al alcohol. Las ratas Wistar que recibieron VE mostraron un incremento en el consumo de etanol tanto en la fase de adquisición como en la fase de mantenimiento vs las ratas Lewis que recibieron el mismo tratamiento. Así mismo en las escalas conductuales, las ratas Wistar mostraron incrementada su actividad locomotora y ansiedad vs ratas Lewis.

En cuanto al efecto del VE sobre el número de neuronas β -endorfinérgicas, se observó que no tuvo efecto en ninguna de las regiones cerebrales consideradas en este estudio. Sin embargo el consumo de etanol si tuvo efecto sobre esta variable, observándose que en conjunto decrementó los niveles de β -endorfinas, aunque sin interacción entre variables. En la pituitaria anterior hubo un efecto importante y fuerte ya que se observaron niveles más elevados de β -endorfinas en ratas Wistar que en ratas Lewis y finalmente en hipotálamo las ratas Wistar mostraron, en conjunto, niveles más elevados de β -endorfinas comparado con ratas Lewis. Ambas líneas de ratas tratadas con VE mostraron un incremento en el consumo de etanol vs los grupos controles, efecto que parece no involucrar los niveles de β -endorfinas. Al respecto los autores del experimento señalan que el alto consumo del etanol por las ratas Wistar podría deberse los altos niveles de β -endorfinas en pituitaria anterior e hipotálamo en estas ratas, y posiblemente a diferencias en la actividad y sensibilidad del sistema opioide endógeno en esta línea de sujetos.

Reforzando aún más el rol de las neuronas b-endorfinérgicas del arcuato hipotalámico, Roth-Deri, Mayan y Yadid (2006) encuentran en ratas hembras de 8 semanas de edad, que una sola inyección intramuscular de VE, causa lesión específica sobre estas células y suprime la adquisición de la autoadministración de cocaína. Este estudio de nuevo nos brinda evidencia del significativo papel de las b-endorfinas en el reforzamiento de la cocaína.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios han mostrado que los estrógenos pueden influir sobre el consumo de alcohol, y que cuando son administrados exógenamente logran alterar muchos sistemas de neurotransmisión y de transcripción genética implicados en el consumo de dicha droga, como lo es el sistema beta-endorfinérgico. Dado que varias líneas de investigación implican a la actividad del sistema de β -endorfinas en la mediación del consumo de etanol, es probable que el estradiol altere el consumo en ratas a través de la acción sobre sus receptores o vía su efecto sobre neuronas β -endorfinérgicas hipotalámicas.

Serie de experimentos han investigado los efectos de una sola inyección de VE en ratas hembras sobre neuronas β -endorfinérgicas en el núcleo arqueado hipotalámico. Las observaciones sugieren que tras la aplicación de una sola dosis de VE (2 mg) se desarrolla un estro persistente y ovarios poliquísticos; y posteriormente se observa una lesión específica en neuronas β -endorfinérgicas en el núcleo arcuato hipotalámico.

Considerando que la ingestión de alcohol produce liberación de β -endorfinas y que estas últimas, se ha descrito, están decrementadas en sujetos alcohólicos, el efecto del valerato de estradiol sobre la integridad de las neuronas β -endorfinérgicas nos proporcionan un modelo interesante que permite estudiar la participación de una deficiencia de β -end en el síndrome de adicción al alcohol. Un reciente proyecto de nuestro laboratorio, que empleó este modelo para estudiar la relación entre el consumo de alcohol y las modificaciones en el contenido de β -end a nivel hipotalámico fue realizado por Juárez et al. (2006), y encontraron que el VE indujo una disminución marcada en el número de neuronas β -endorfinérgicas del arcuato hipotalámico, paralelo a un incremento significativo en el consumo de etanol, en las semanas 4 y 5 posteriores a la inyección de VE. Previamente Marinelli et. al., (2003) ya habían encontrado que bajo ciertas circunstancias, los sujetos portadores de esta deficiencia de neuronas β -endorfinérgicas, presentaban incrementada su conducta de ingesta de alcohol.

Por otra parte, se conoce que si los ovarios son extirpados antes de la inyección de VE la citotoxicidad en el núcleo arqueado hipotalámico no se desarrolla, lo cual sugiere fuertemente la participación de un proceso a través de las gónadas para que se genere la muerte celular. Dado que es bien conocido que el ovario poliquístico produce niveles suprafisiológicos de hormonas sexuales, se podía deducir que éstas podrían tener un papel importante en este proceso de citotoxicidad en hipotálamo.

A pesar de que Schipper et. al. (1981), ya había sugerido esta posibilidad, no fue hasta 2006 cuando Valenzuela realizó un estudio con el fin de analizar el papel de los estrógenos endógenos en la citotoxicidad producida por los estrógenos exógenos, es decir, por el valerato de estradiol. En ese estudio hubo dos grupos tratados con VE, uno de los cuales recibió letrozol (LTZ) (inhibidor de aromatasas), con lo cual la muerte de neuronas β -endorfinérgicas fué inhibida parcialmente, aunque los efectos fueron significativos. Este efecto fue parcial si consideramos el número promedio de neuronas de este tipo descritas por Juárez, Camargo y Gómez (2006) en un grupo control. Además estos hallazgos no afectaron los consumos de alcohol posiblemente debido en parte al efecto parcial en la inhibición de la citotoxicidad en neuronas β -endorfinérgicas.

Con esta base, consideramos necesario estudiar una dosis mayor del inhibidor de la biosíntesis estrogénica con el fin de obtener una inhibición mayor de la muerte celular de neuronas β -endorfinérgicas y en el mejor de los casos una inhibición total. Al mismo tiempo poder evaluar este efecto sobre el consumo de alcohol en sujetos con una diferencia más clara en su sustrato anatómico generador de β -endorfinas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la participación de los estrógenos endógenos en la citotoxicidad producida por el VE sobre neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico y analizar la relación de éstos fenómenos con el consumo de alcohol.

Objetivos particulares:

Observar las alteraciones en el ciclo estral a través de la conducta y de la exploración de la citología vaginal, producidas por el VE y LTZ en los grupos experimentales.

Conocer las variaciones en el consumo de alcohol en el modelo de citotoxicidad en hipotálamo, producido por la administración de VE.

Detectar si el decremento en el número de neuronas β -endorfinérgicas hipotalámicas es debido a la sobreestrogenización endógena inducida por el VE.

Evaluar el efecto de cada uno de los tratamientos sobre la cantidad de neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico.

V. HIPÓTESIS

Hipótesis general

Los estrógenos endógenos median los mecanismos de toxicidad que produce el VE en neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico lo cual incrementa el consumo de alcohol.

Hipotesis específicas

- Una sola dosis de VE provocará estro persistente en las hembras, acompañado de pautas conductuales características de esta etapa; reducirá el consumo de alimento inmediatamente después de su aplicación y por tanto el peso en el mismo lapso; reducirá el número de neuronas β -end en el núcleo arcuato hipotalámico; e incrementará el consumo de etanol entre la cuarta y quinta semana post-VE.
- La inhibición de la biosíntesis estrogénica a través de un inhibidor de la enzima aromatasasa (LTZ), provocará una ganancia en el peso corporal de los sujetos

privados de estrógenos; evitará la citotoxicidad sobre neuronas β -endorfinérgicas; e impedirá el incremento en el consumo de etanol entre la cuarta y quinta semana post-VE.

VI. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

6.1 VARIABLES INDEPENDIENTES:

* Valerato de Estradiol (2mg en 0.2ml de aceite; inyección única; i.m.) en sujetos con ovarios intactos.

* Aplicación de un inhibidor de aromatasa no esteroide (Letrozol, 375 μ g/kg/día; s.c.) posterior a la administración de VE.

6.2 VARIABLES DEPENDIENTES:

* Consumo de alcohol

* Peso corporal de los sujetos

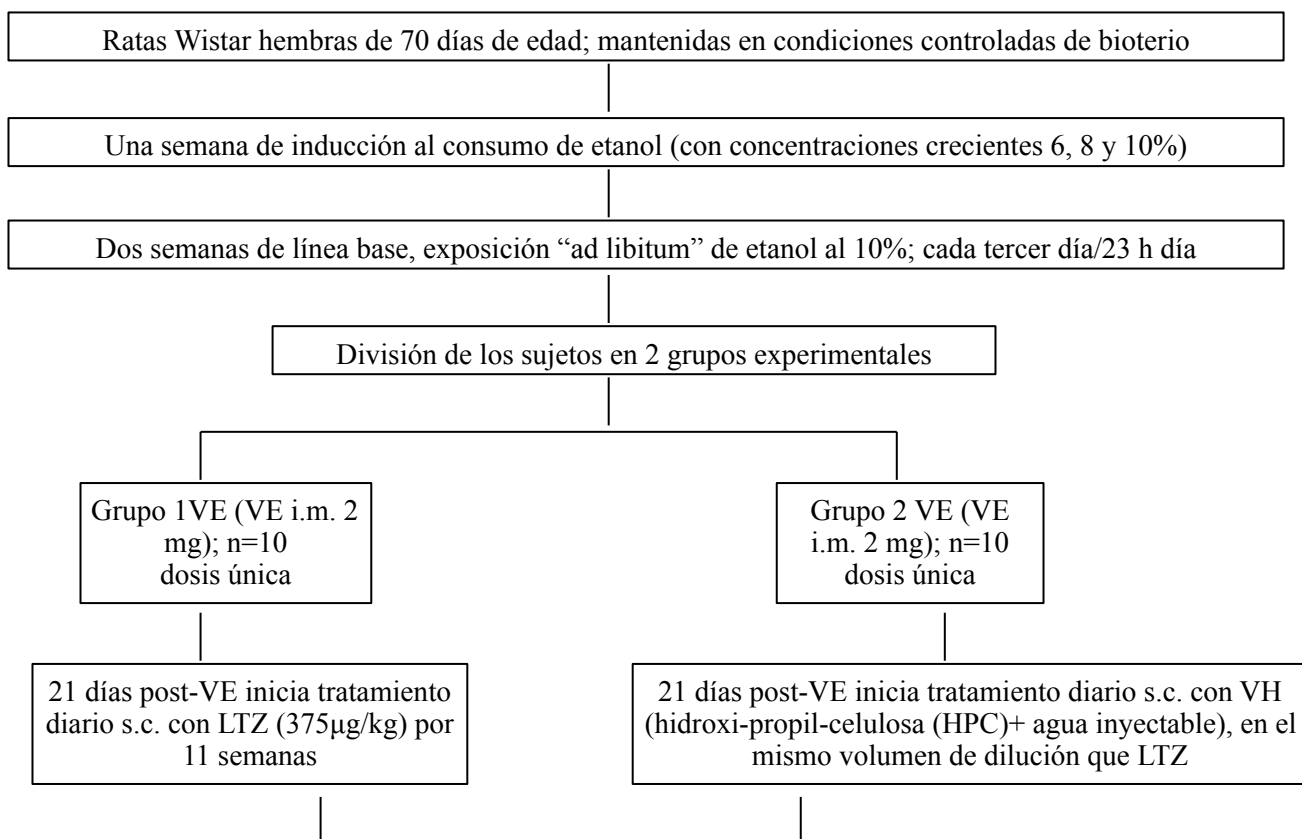
* Consumo de alimento

* Citología vaginal

* Número de neuronas β -endorfinérgicas.

6.3 SUJETOS: Se utilizaron 20 ratas hembras Wistar, adultos jóvenes de 70 días de edad, procedentes de 10 camadas diferentes del Laboratorio de Farmacología del Instituto de Neurociencias. Hubo dos grupos, con una n=10, cada uno. Los sujetos se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad, 12/12hrs, con alimento ad libitum (croquetas Ralston Rations, Purina) (Fig. 4).

6.4 DISEÑO EXPERIMENTAL



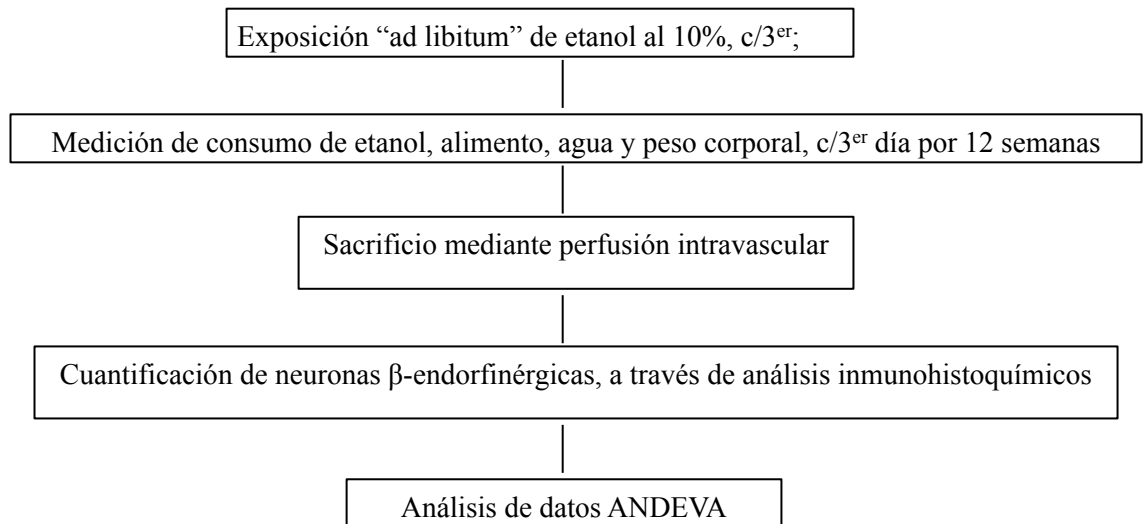


Fig. 4 Esquema representativo del diseño experimental

6.5 CONDICIONES DE LABORATORIO: Estos sujetos se colocaron en cajas individuales, de 18 cm de ancho x 27 cm. de alto, a una temperatura entre 22 y 24°C.

6.6 INDUCCIÓN AL ALCOHOL: Los sujetos se sometieron a un periodo de inducción al alcohol (8 días), donde las concentraciones se aumentaron paulatinamente (inicialmente 6%, 8% y finalmente 10 %).

6.7 LINEA BASE: 14 días previos a la inyección de Valerato de estradiol (VE), o Vehículo (VH) los sujetos fueron expuestos al consumo voluntario de alcohol (concentración al 10%) para determinar el nivel basal de consumo. El registro se realizó tres veces por semana. Los sujetos continuaron expuestos cada tercer día (lunes, miércoles y viernes) al consumo voluntario de alcohol (concentración al 10%), durante todo el experimento, es decir 14 semanas a partir de la obtención de los niveles basales de consumo.

6.8 ASIGNACIÓN DE LOS SUJETOS A LOS GRUPOS: Se seleccionaron a las hembras que presenten por lo menos dos periodos regulares de estro completo. Para asignar a los sujetos a ambos grupos, ordenamos de mayor a menor los consumos

presentados durante la línea base y se asignaron alternadamente para que los grupos tuvieran sujetos con consumos similares. El grupo 1 corresponde a 10 hembras tratadas con VE las cuales, 21 días después recibieron un inhibidor de aromataasa (grupo VE +LTZ). El segundo grupo representa a los sujetos que recibieron VE y a las cuales 21 días después se les aplicó el VH correspondiente al LTZ (grupo VE+VH).

6.9 PESO, AGUA Y ALIMENTO: Se midió 3 veces por semana la ingesta de alimento en g, así como el consumo de agua en ml., y el peso corporal en kg, de los sujetos.

6.10 TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS: Se administró Valerato de Estradiol VE (2 mg en 0.2 ml de aceite) inyección única; vía intramuscular a los grupos 1 y 2. Este fármaco se dejó actuar sin interrupción en el acceso al alcohol.

6.11 TRATAMIENTO CON LETROZOL: Tres semanas después de haberse aplicado el VE se administró el LTZ, 375 µg/kg/día, s.c. a las 10 ratas del grupo 1, el grupo 2 recibió solamente Vehículo (hidroxi-propil-celulosa + agua inyectable). Este tratamiento tuvo una duración de 11 semanas.

6.12 CITOLOGÍA VAGINAL: Se evaluó la ciclicidad de los sujetos por medio de frotis vaginales, durante 2 ciclos consecutivos, previos a la aplicación de la inyección de VE.

6.13 PERFUSIÓN: Los sujetos se sacrificaron mediante perfusión intravascular, bajo anestesia profunda por inyección ip de pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso). Los animales anestesiados fueron inmovilizados en posición decúbito dorsal, se practicó toracotomía amplia para exponer el corazón y los pulmones, con pinzas de mosquito se pinzaró la arteria aorta torácica descendente y se realizó una incisión en el vértice del ventrículo izquierdo para introducir una cánula roma del número 18. Inmediatamente después, se seccionó la aurícula derecha y durante 3 min se administraron 250 ml de una solución lavadora a temperatura corporal, la cual está compuesta por 0.9% de solución salina isotónica con 1 g de procaína (sigma P-9879) y 1,000 unidades de

heparina/litro (Sigma H-3393), bajo presión de 140 cm de columna de agua, para eliminar la mayor cantidad de sangre. Enseguida, a temperatura ambiente, se hicieron pasar 250 ml durante 3 min de una solución fijadora compuesta por 4% de paraformaldehído (Sigma P-6148) amortiguado en fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.3 y 401 (± 10) Mosm/l. Posteriormente se decapitó a los sujetos y los cerebros fueron extraídos.

6.14 CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE NEURONAS INMUNOREACTIVAS A B-ENDORFINAS (B-END): Una vez realizado el sacrificio, perfusión y crioprotección de los cerebros (sacarosa al 30 % y goma arábiga al 2.5%, disuelta en amortiguador fosfato 0.1M a pH 7.3), se realizaron tres cambios sucesivos de 60 min en PBS en los cortes coronales cortados a un espesor de 50 μ m en un crióstato. En estos tejidos se efectuó el estudio inmunohistoquímico para identificar la inmunoreactividad en neuronas inmunopositivas a β -end.

6.15 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA B-ENDORFINAS: Con ayuda de un criostato (Leica CM1850) se realizaron cortes de 50 μ m de espesor en los tejidos previamente crioprotectados. Los tejidos montados en portaobjetos se hidrataron con PBS 0.1 M durante 5 minutos por tres veces. Posteriormente se bloquearon las peroxidasas endógenas con una solución compuesta por metanol al 10%, peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 0.1 M pH 7.4 durante 20 minutos, se realizaron lavados nuevamente con PBS y se procedió a bloquear los sitios inespecíficos con 100 μ l a cada portaobjetos de suero normal de cabra al 3% en PBS 0.1 M, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se aplicó el anticuerpo (Ac) primario. El Ac primario empleado es policlonal, generado en conejo contra β -end. de rata (inmunógeno) (cat. T-4045 Lab. Península) en dilución 1:500, la incubación se realizó durante 16 h a 4°C; Después de realizar 3 lavados con PBS 0.1M se añadieron 100 μ l del Ac. secundario (Ac. de enlace, vector BA1000) IgG biotilado generado en cabra contra IgG de conejo en dilución 1:250 el cual se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Posterior a esto se realizaron nuevamente 3 lavados con la solución de PBS 0.1M a pH 7.4 para incubarse con el complejo de avidina-biotina (ABC Vector PK-4000), el revelado de la reacción se realizó con una solución de DAB-H₂O₂ al 0.07% y 0.1%,

respectivamente, durante 10-15 min. hasta que obtuvimos un precipitado con coloración marrón. Los tejidos fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol etílico (50, 70, 80,90 y 100%) y xilol absoluto por 5 minutos respectivamente y montados con resina sintética entellan (Merck 1079610500), para su posterior análisis cuantitativo. Se empleó un sistema automatizado para análisis de imágenes Leica Q550IW. El análisis se realizó en las zona correspondiente al núcleo arcuato hipotalámico, cuantificando un área aproximada por sujeto de estudio de 27,360 μm^2 a 500 aumentos en ensayo de doble ciego.

6.16 CONSIDERACIONES ÉTICAS: El cuidado y manejo de animales se realizó de acuerdo a los lineamientos especificados por la Guide for the care and use of laboratory animals neuroscience and behavioral research (Nacional Research Council of the National Academies, 2003). En todos los procedimientos, se procuró emplear el menor número de animales posible y se trató de evitar al máximo su sufrimiento (Anexos).

VII. RESULTADOS

Los resultados correspondientes a los datos arrojados por ambos grupos (VE+LTZ y VE+VH) se agruparon en bloques por semanas (promediando 3 días/sem). Únicamente para la línea base se promediaron los consumos de las dos semanas para obtener un solo valor. Esta estrategia de promedios semanales se replicó en el análisis de cada variable de interés.

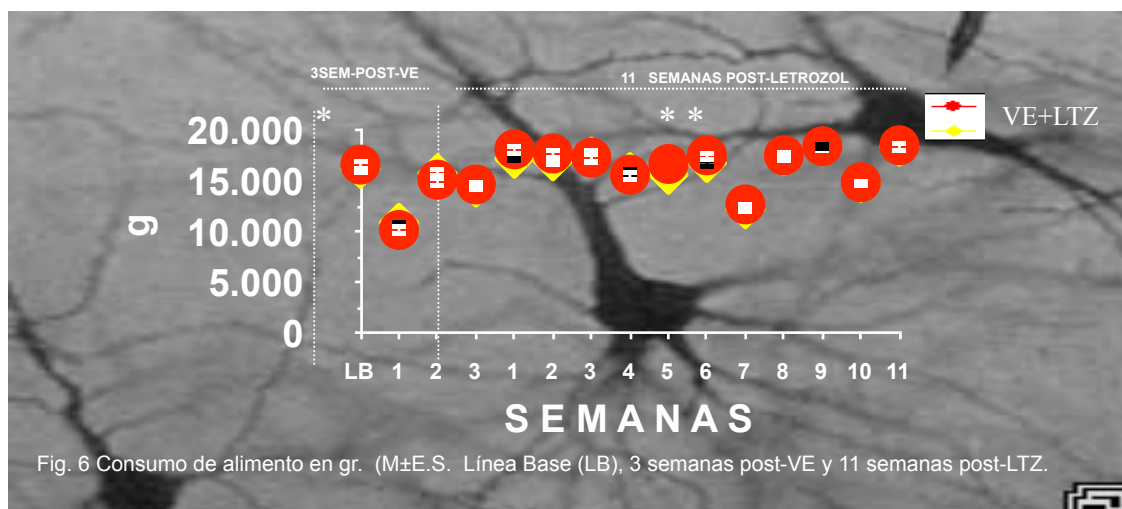
CONSUMO DE ALCOHOL

El consumo de etanol se expresó en g/kg de peso corporal, y fue ininterrumpido durante el experimento. Para realizar el análisis estadístico empleamos un ANOVA de 2 factores (Grupo x semana), diseño mixto de parcelas divididas. El factor B, semanas, fue significativo ($F(14,252) = 9.74$, $P = 0.0001$) (Fig 5), y el análisis posterior (Tukey 5%), mostró que la semana 5 POST-VE fue significativamente mayor que la línea base, las semanas 1 y 2 POST-VE, y que las semanas 4, 6, 7, 8, 9, 10 Y 11 POST-LTZ (Fig. 5). Es decir el análisis a posteriori indica que los consumos incrementaron en la quinta semana post-VE independientemente del tratamiento con LTZ o VH; sin embargo, se observó una clara tendencia a ser mayor mayor el consumo de alcohol en el grupo VE +VH.



CONSUMO DE ALIMENTO

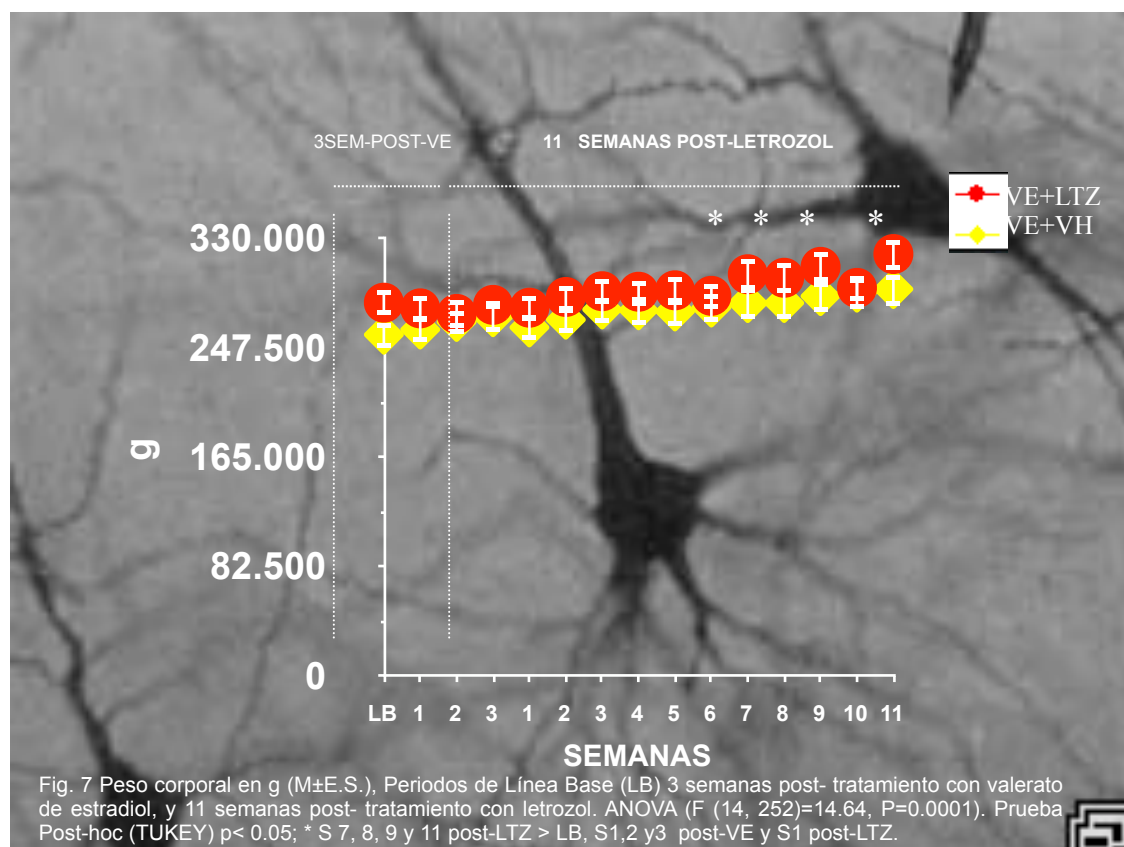
Realizamos el análisis estadístico a través de un ANOVA 2 factores (grupo x semana), diseño mixto de parcelas divididas. El consumo de alimento se evaluó en g, y pudimos observar que el VE decrementó el consumo de alimento en la semana siguiente a su aplicación. El factor B, semanas, fue significativo ($F(14, 252)=75.85, P=0.0001$), (fig 6). El análisis posterior (Tukey 5%), mostró que el consumo de alimento en la semana 1 post-VE fue significativamente menor que la LB, las semanas 2 y 3 post-VE, y que todas las semanas post-LTZ o post-VH, excepto la semana 7; es decir, este efecto ocurrió como consecuencia del tratamiento con VE, pero independiente del grupo.



A pesar del efecto del VE decrementando el consumo de alimento en la semana 1 posterior a su administración, dicho fármaco no afectó el peso corporal de los sujetos (Fig. 7).

PESO CORPORAL

La realización del análisis estadístico fue a través de un ANOVA 2 factores (Grupos x semana), diseño mixto de parcelas divididas. El factor B, semanas, fue significativo ($F(14, 252)=14.64, P=0.0001$) y el análisis posterior (Tukey 5%), mostró que las semanas 7, 8, 9 y 11 post-LTZ o post-VH fueron significativamente mayores que la LB, que las tres semanas post-VE y que la primera semana post-LTZ o post-VH independientemente del grupo (Fig. 7).



A pesar de que evidentemente el tratamiento con Letrozol produjo un ligero incremento en el peso corporal en relación al grupo Vehículo, dicha diferencia no fue significativa. Atribuimos este efecto a la privación estrogénica ejercida por el inhibidor de aromatasa.

CONSUMO DE AGUA

La realización del análisis estadístico fue a través de un ANOVA 2 factores (grupo x semana), diseño mixto de parcelas divididas. El factor B, semanas, fue significativo ($F(14, 252) = 14.68, P = 0.0001$) y el análisis posterior (Tukey 5%), mostró que la semana 2 POST-VE fue significativamente mayor que la LB, las semanas 1 y 3 POST-VE. Así mismo, la semana 5 POST-VE o semana 2 POST-LTZ, fue significativamente mayor que las semanas de la LB, semanas 1 y 3 POST-VE y semana 10 POST-LTZ (Fig. 8).

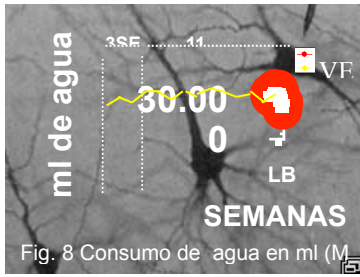


Fig. 8 Consumo de agua en ml (M

NÚMERO DE NEURONAS β -ENDORFINÉRGICAS EN EL NÚCLEO ARCUATO HIPOTALÁMICO, TRAS EL TRATAMIENTO CON VE Y CON LTZ

Una vez realizado el sacrificio, perfusión, crioprotección, y el posterior corte coronal a 50 μ m de los cerebros, efectuamos un estudio para identificar la inmunoreactividad en neuronas inmunopositivas a β -end. Al evaluar la población de neuronas inmunoreactivas a β -end en la región del núcleo arcuato hipotalámico a través de un análisis inmuno-histoquímico, complementado con microscopía óptica, obtuvimos datos altamente significativos, al ser sometidos a análisis estadísticos. El grupo que recibió el inhibidor de aromatasa, tras haberle sido administrada la dosis única de Valerato de Estradiol (2mg) mostró aproximadamente 6 veces el número de neuronas β -endorfinérgicas que el grupo que recibió solamente vehículo ($t(4)=13.44$, $p=0.0002$) (fig 9).

El análisis estadístico elegido para dichos datos, fue el análisis correspondiente a una T de student para grupos independientes.

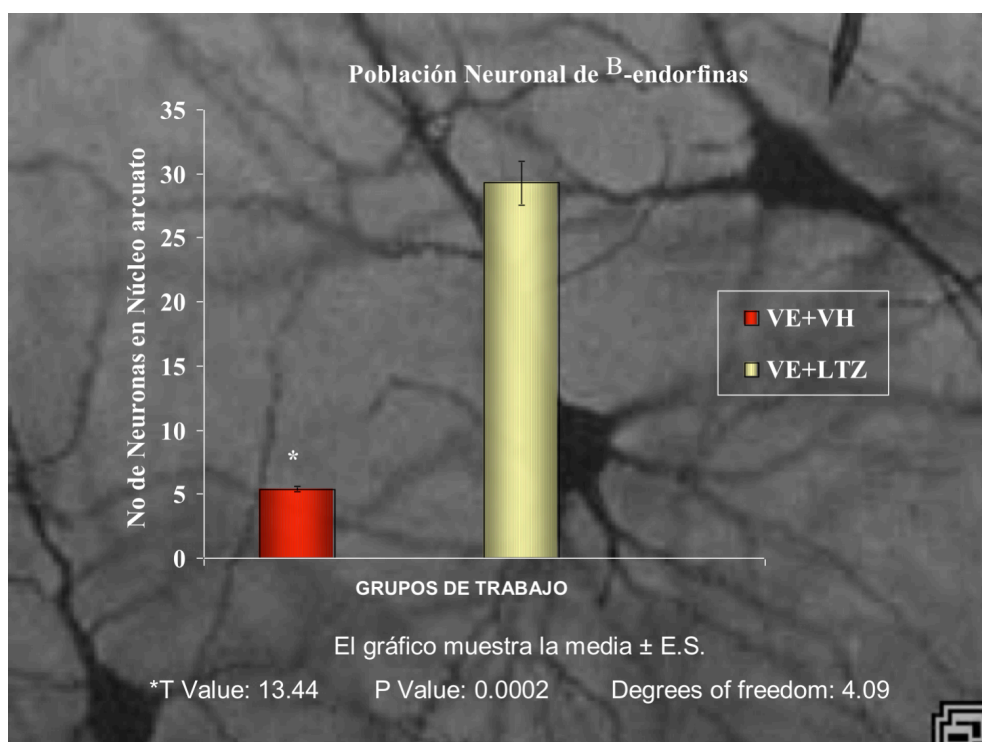
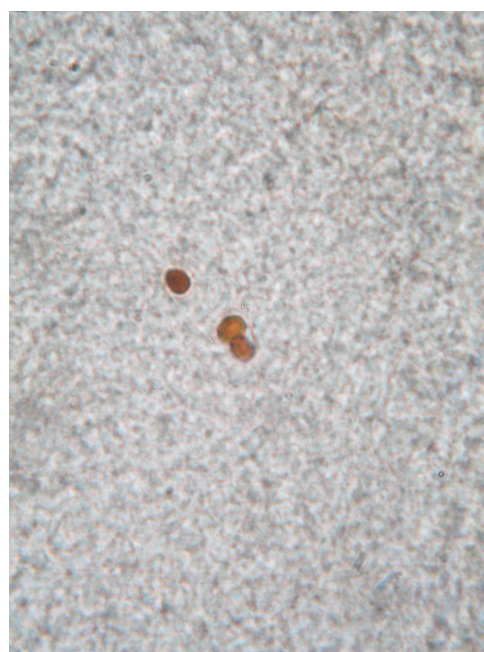
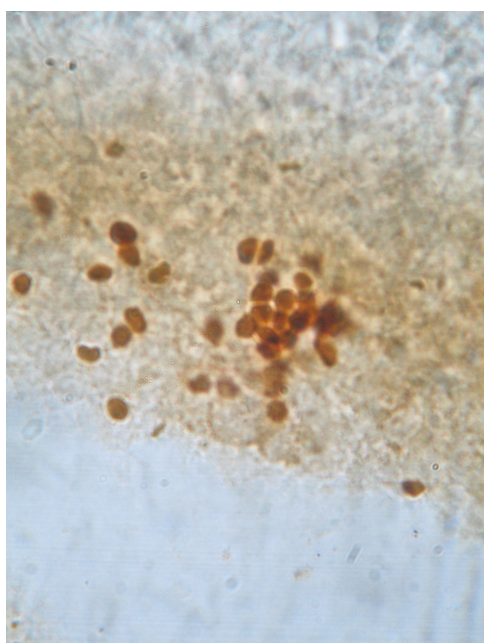
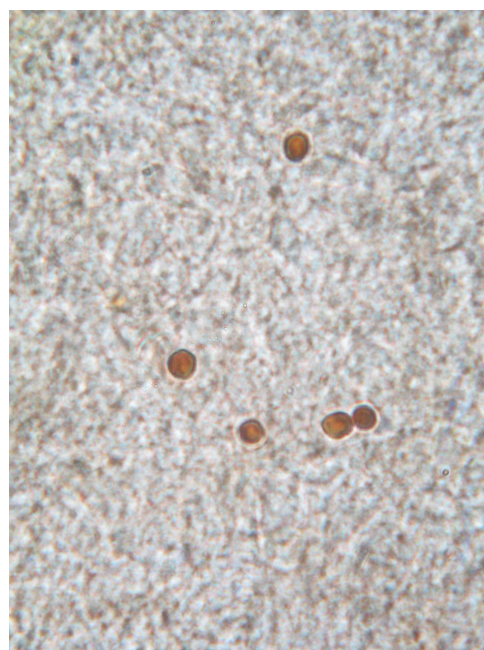
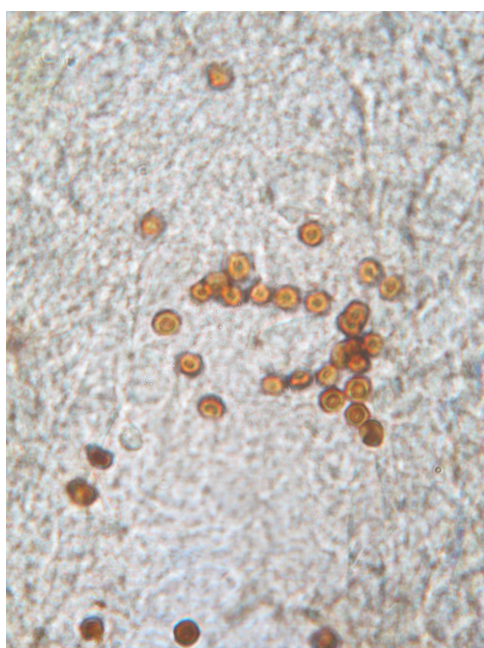


Fig 9. La gráfica muestra la población de neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico. En el eje de las abscisas se observan los 2 grupos experimentales ($n=5$) y en el eje de las ordenadas se muestra el número de neuronas, así, cada barra representa a un grupo. Se muestra la media \pm el error estándar.

Es decir el inhibidor actuó favorablemente a nivel central, al proteger a dichas células del núcleo arcuato hipotalámico de la citotoxicidad producida en este modelo de estrogenización crónica. Estos resultados fueron congruentes con la hipótesis planteada en nuestro estudio. A continuación se muestran imágenes de las células cuantificadas, a la izquierda aquellas correspondientes sujetos del grupo VE+LTZ y a la derecha del grupo VE+VH.



CITOLOGÍA VAGINAL

En cuanto a la citología vaginal, la evaluación de la ciclicidad de los sujetos a través de frotis vaginal, permitió que observáramos cornificación persistente (estro continuo) durante el monitoreo de la citología vaginal de los sujetos de ambos grupos, este efecto se mantuvo hasta el final del experimento (y comenzó sobre la tercera semana luego de haber sido administrada la única dosis de VE). Este efecto del VE sobre el ciclo estral de la rata demuestra que una dosis alta de estradiol altera la ciclicidad normal en la rata hembra, lo cual implica una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Conductualmente las hembras manifestaron lordosis, que forma parte de las características de esta etapa estral. Lo anterior sugiere que la estrogenización crónica observada en nuestro trabajo experimental fue inducida por la única dosis de VE (2 mg) que administramos.

DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos son consistentes con un estudio previos de nuestro laboratorio (Juarez et al., 2006) y con la aseveración de Reid et al. (2002) quienes indican que cuando el VE, dado a esta dosis crónica, es administrado después de que los consumos han sido bien establecidos (línea base), se puede observar un incremento marcado en los consumos de bebidas alcohólicas. En el presente estudio decidimos no interrumpir el acceso voluntario hacia la bebida alcohólica y observamos que justo al tiempo en que se ha reportado que el apetito por dichas soluciones ha iniciado, (4 o 5 semanas post-VE), los sujetos de ambos grupos incrementaron el consumo significativamente, independientemente del tratamiento con el inhibidor de la biotransformación estrogénica o su respectivo vehículo. La literatura indica que cuando las bebidas alcohólicas son presentadas continuamente por muchos días posteriores a la iniciación de la liberación continua de E2 o son presentadas después, existe algún ajuste a la sobreestrogenización causada por el E2 y se presentan consumos incrementados de bebidas alcohólicas (Marinelli et al. 2003; Reid et al. 2003).

En otro experimento realizado por Reid et al. (2002), administraron VE (2 mg/rata) uno y dos meses antes de la primera exposición al alcohol voluntario. En el grupo que recibe VE y un mes después se le expone al etanol, se observó que dicho consumo se incrementó significativamente con respecto al grupo que recibe VE y dos meses después son desafiados a dicho consumo, y con respecto al grupo placebo. Aunque la metodología de este segundo experimento no es parecida a los métodos empleados en el presente estudio, el incremento en el consumo de etanol observado por ellos concuerda con los incrementos observados durante el post-tratamiento en la presente investigación. Reid et al. (2003), en un estudio posterior, indica que la primera exposición al alcohol (12%) 15 días después de administrar el VE (2mg), es tiempo suficiente para incrementar en forma significativa el consumo de alcohol con respecto al grupo placebo. Sin embargo, la literatura indica que la lesión hacia neuronas β -endorfinérgicas ocurre hasta un mes post-VE (Brawer et al. 1978; Brawer et al. 1980).

Marinelli et al. (2003), empleando este mismo modelo, expuso a los sujetos por primera vez al alcohol nueve semanas post-VE, y tras 8 días del periodo correspondiente a la inducción, durante el cual se presentaron concentraciones crecientes de dicha droga, encontró que se incrementa significativamente el consumo de alcohol en las dos cepas de ratas empleadas (Wistar y Lewis), justo en las semanas 10 y 11 post-VE, indicando que no solo, después de 1 mes (Reid et al. 2002) ni tampoco solo después de 15 días (Reid et al. 2003) es posible desencadenar el efecto sobre la ingesta de bebidas alcohólicas, sino que a diferencia de Reid et al. (2002), ellos encuentran que 2 meses post-VE el incremento ocurre. Los datos anteriormente mencionados, indican que definitivamente el periodo post-VE es crucial en el efecto sobre el consumo del etanol.

En la presente investigación no se agregó ningún tipo de endulzante a la bebida alcohólica y los resultados apoyan el incremento en el consumo de etanol previamente descrito (Reid et al. 2002; Reid et al. 2003; Marinelli et al. 2003; Juárez et al., 2006) posterior a la administración crónica de estradiol. Además consideramos que la exposición voluntaria al alcohol sin endulzante aporta datos más confiables, dado que es ampliamente conocido que el azúcar es un supraestímulo al ser añadido a la bebida que será presentada.

A pesar de que Reid et al. (2002) indican que la propensión para beber mayor cantidad de bebidas alcohólicas se manifiesta meses post-VE y que una vez observada, tiende a sostenerse por meses, nosotros concluimos que para conciliar los resultados de la literatura con los del presente estudio a partir de este modelo de citotoxicidad hipotalámica por una sola dosis de VE, es necesario manejar una metodología común, ya que una revisión exhaustiva de cada experimento pone de manifiesto que se han elegido muy variadas estrategias, específicamente entre la primera oportunidad para beber alcohol una vez aplicado el VE, así como el empleo de supraestímulos añadidos a la solución alcohólica presentada, y por último es importante también, la variabilidad entre los periodos de exposición, ya que es muy diferente el presentar de manera limitada una bebida alcohólica, a presentarla ilimitadamente.

Nuestros resultados son similares con hallazgos previos, en los cuales se ha estudiado el efecto del VE sobre patrones de consumo de etanol (Reid et al. 2002; Reid et al., 2002, 2003; Marinelli et al. 2003; Juárez et al., 2006), en los cuales se sostiene que los cambios inherentes a dosis farmacológicas de E2 pueden inducir un gran apetito por bebidas alcohólicas.

En el presente proyecto, la ingesta de etanol en ratas tratadas con VE mostró cambios significativos a lo largo del post-tratamiento en ambos grupos, es decir, el VE modifica o afecta a dicha variable significativamente, sin embargo, el tratamiento con el inhibidor de aromatasas (LTZ) no afectó el consumo como se esperaba, ya que nuestra hipótesis señala que este fármaco evitará los efectos centrales del VE sobre el hipotálamo y por ende los efectos conductuales sobre el consumo de alcohol. Este hallazgo apoya que la administración de VE a ratas con ovarios intactos incrementa significativamente el consumo por la bebida alcohólica en el periodo en el cual se ha descrito que el apetito por tal preparación se ve incrementado (Reid et al. 2003; Juárez et al., 2006), mismo periodo en el cual el VE ha cesado su liberación y ha desaparecido del organismo. Sin embargo, el hecho de que el LTZ no haya inhibido el incremento en el consumo de alcohol, posiblemente se deba a la estrategia de exposición al alcohol, a una sobrerregulación de receptores opioides o bien a una actividad incrementada compensatoria de las neuronas sobrevivientes en el núcleo arqueado hipotalámico. Esta hipótesis es consistente con la de Juárez et al. (2006), formulada a partir del efecto observado sobre el incremento en el consumo del etanol en las semanas 4 y 5 post-VE, el cual no se mantuvo en las semanas subsiguientes, con lo cual se especuló que el déficit inicial de niveles de β -endorfinas ocasionado por la pérdida de neuronas β -endorfinérgicas que sintetizan dicho péptido, no se mantiene por mucho tiempo y ocurre una actividad incrementada de la síntesis de β -endorfinas por aquellas neuronas que aún sobreviven.

Además consideramos posible el que estos hallazgos indican que el incremento en el consumo de etanol no es atribuible solamente al número de neuronas β -endorfinérgicas

del NAH, sino a los niveles del péptido, dado que el LTZ si inhibe totalmente la muerte de neuronas secretoras de POMC, y en este estudio no se midieron niveles.

Es importante destacar que la lesión en neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico, no ocurre en ratas ovariectomizadas previamente al tratamiento de VE (Brawer et al. 1980), indicando que la patología evoluciona en respuesta a una exposición ininterrumpida a concentraciones no fisiológicas de estradiol, producidas por los ovarios como resultado de la agresión inicial del VE hacia el eje neuroendocrino. Este antecedente junto a nuestras propias hipótesis, nos condujeron a utilizar un inhibidor de la biosíntesis estrogénica, para evitar la sobreestrogenización desencadenada por el VE, y determinar así, si son los estrógenos endógenos los desencadenantes de la neurotoxicidad del NAH en el modelo de estrogenización crónica inducido por una sola dosis de VE.

Nuestros hallazgos apoyan el efecto anoréxico que ejerce el tratamiento con estradiol tanto en hembras (Juárez et al., 2006) como en machos (Juárez et al., 2005) y que ha sido ampliamente descrito previamente. Este efecto se ha intentado explicar bajo el supuesto de que existe una acción estrogénica a nivel hipotalámico que provoca un incremento en los niveles de colecistocinina (CCK) que genera estados de saciedad. Encontramos que justo después de la inyección de VE, se detectó una pérdida de peso que puede no ser significativa, o bien una pausa en la ganancia de peso a lo largo de la primera semana post-VE y se acompañó por una reducción en la ingesta de alimento.

La reducción en el consumo de alimento provocada por el tratamiento con VE, se extendió a una semana post-VE y la consecuente falta de ganancia de peso, cesó a los 21 días post-VE, es decir coincide con el tiempo en el cual el VE ya no está liberando dosis farmacológicas de estradiol. Los cambios dinámicos que ocurren en el peso corporal de sujetos tratados con VE, ocurren en ratas con y sin oportunidad para tomar bebidas alcohólicas. La pérdida de peso inicial, puede indicar malestar físico en respuesta a la variedad de disturbios potenciales en la homeostasis y generalmente ratas indispuestas no son ávidas consumidoras de bebidas alcohólicas.

Por su parte el análisis de consumo de agua mostró una ligera tendencia al incremento en ambos grupos, en la cuarta semana post-VE, y nos parece razonable el proponer que este incremento también se acompaña de la desaparición en sangre de niveles elevados de estrógenos exógenos, y por ende por el desvanecimiento de sus efectos indeseables.

Valenzuela (2006), demuestra que la exposición a altas concentraciones fisiológicas de E2, iniciadas por el tratamiento con VE, provocan destrucción de neuronas β -endorfinérgicas dentro del NAH, y que la administración de un inhibidor de la enzima aromatasa, la cual cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos por el ovario, ejerce un efecto protector sobre dichas células, apoyando la hipótesis de que son los estrógenos endógenos producidos por los ovarios, los responsables de dicha citotoxicidad. La destrucción de neuronas hipotalámicas β -endorfinérgicas, inducida con dosis crónicas de E2 demostrada por Valenzuela (2006), da como resultado una desconexión funcional de lazos neuroendocrinos que regulan la ciclicidad reproductiva (Carriere et al. 1989). Entonces, los esteroides participan en el rompimiento de funciones biológicas que normalmente facilitan.

Se especula que parte de los mecanismos subyacentes a la acción neurotóxica sobre el NAH del VE, involucra la conversión de estradiol a catecol estrógenos y la subsecuente oxidación a radicales libres o-semiquinona. Esta pérdida de neuronas β -endorfinérgicas del NAH desencadena un incremento compensatorio de ligandos μ en el área preóptica medial, con lo cual esta área se torna supersensible a estos y otros opiodes endógenos, que tienen acción inhibitoria sobre células GnRH que exhiben sobreexpresión de receptores a opioides (ligandos μ), y a pesar de esperarse que con la deafferentación señalada se incrementaran los niveles plasmáticos de LH, paradójicamente ocurre lo contrario. Así, la persistente inhibición resultante de la liberación de GnRH puede desencadenar el modelo de liberación LH crónicamente suprimido, hacia el cual los ovarios responden volviéndose poliquísticos.

Este decremento observado en neuronas β -endorfinérgicas, aunado al desarrollo de ovarios poliquísticos, pueden indicar que el efecto inducido por el VE es de significación clínica.

Nuestros presentes hallazgos refuerzan nuestras hipótesis ya que el papel neuroprotector que ejerció el inhibidor de aromatasa en la dosis elegida, sobre la población de células β -endorfinérgicas del arcuato hipotalámico, es congruente con nuestros supuestos. Dichos resultados complementan el descubrimiento de otro estudio de nuestro laboratorio, realizado por Juárez et al. (2006), en el cual la población de células de un grupo que recibe VE solamente, reduce dramáticamente el número de células (media = 2.63) con respecto a su control que recibe el vehículo (media = 31.71). El presente proyecto remeda dichos resultados al encontrar que el inhibidor de la biosíntesis estrogénica en la dosis de 375 μ g/kg protegió totalmente a estas células, encontrando medias similares en nuestros grupos VE+LTZ y VE+VH.

En cuanto a los efectos del VE sobre la citología vaginal de los sujetos, encontramos que éstos exhibieron cambios irregulares en la citología vaginal durante el periodo precedente a la condición de estro persistente. El estro persistente fue evidente sobre la tercera semana post-VE, hallazgo consistente con diversos estudios (Juárez et al., 2006; Valenzuela, 2006).

La presente investigación sustenta el que una sola inyección de VE dada a ratas hembras adultas que ciclan normalmente, provoca anovulación crónica y cornificación vaginal persistente. Este estudio apoya que la exposición a altas concentraciones fisiológicas de E2, iniciadas por el tratamiento con VE, provocan destrucción de neuronas β -endorfinérgicas dentro del NAH, y que la administración de un inhibidor de la enzima aromatasa, la cual cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos por el ovario, ejerció un efecto protector sobre dichas células, apoyando nuestra hipótesis de que son los estrógenos endógenos producidos por los ovarios, los responsables de dicha citotoxicidad.

Consideramos que este estudio esclarece el papel de los estrógenos endógenos sobre la citotoxicidad en neuronas POMC del NAH. Además dado que no hay una diferencia significativa entre el número de neuronas β -endorfinérgicas de nuestro grupo VE+LTZ y un grupo control de Juárez et al. (2006), encontramos que la realización del presente

estudio explora de manera clara el mecanismo preciso a través del cual, en estas condiciones experimentales, se produce la depleción selectiva de dichas células.

El cerebro es uno de los principales blancos de las hormonas esteroideas sexuales; si se considera el amplio uso de compuestos que inducen actividad estrogénica continua por las mujeres, especialmente en terapias de restitución hormonal, post-menopáusica o post-traumática resulta importante investigar los efectos centrales y periféricos de compuestos estrogénicos sobre marcadores específicos de la función neuroendocrina.

CONCLUSIONES:

□ El VE:

- Provocó estrógeno continuo en las hembras, así como pautas conductuales características de dicha etapa del ciclo estral.
- Incrementó el consumo del alcohol en la quinta semana POST-VE, concordando con el estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio, independientemente del tratamiento con LTZ o con VH.
- Decrementó el consumo de alimento (en ambos grupos, significativamente en la primera semana).
- Decrementó de forma drástica el número de neuronas β -endorfinérgicas en el núcleo arcuato hipotalámico, en el grupo VE+VH.

□ El tratamiento con Letrozol:

- No produjo efecto significativo sobre el consumo de alimento y peso.

- La inhibición estrogénica, al parecer, no ejerce ningún efecto sobre el consumo del alcohol.
- Fue capaz de inhibir de manera significativa la citotoxicidad en neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico.

□ Conclusión integrativa:

- Es posible que el incremento en el consumo de etanol no sea mediado por el número de neuronas β -endorfinérgicas sino por los niveles de este péptido.

REFERENCIAS

A. Brodie, Jelovac D., Long B. J. (2003). Predictions from a preclinical model: studies of aromatasa inhibitors and antiestrógenos. *Clin Cancer Res*, 9: 455S-9S.

A. Brodie, Q Lu, Y Liu & Long. (1999). Aromatase inhibitors and their antitumor effects in model systems. *Endocrine-Related Cancer*, 6-205-210.

Acuña Mourín., (2002). Receptores y opioides endógenos y exógenos. III Congreso Estudiantil Virtual de Ciencias Médicas CEV.

Altman J., Everitt B. J., Glautier S., Markou A., Nutt D., Oretti R., Philips G. D., Robbins T. W. (1996). The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacology (Berl)*, 125(4): 285-345.

A. S. Bhatnagar, C. Batzl, A. Häusler, V. Nogués. (1993). The role of estrogen in the feedback regulation of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *J. Steroid Biochem Molec. Biol.*, 47 (1-6) 161-166.

A. S. Bhatnagar, A. M. H. Brodie, B. J. Long, D. B. Evans, W. R. Miller., (2001). Intracellular aromatasa and its relevance to the pharmacological efficacy of aromatasa inhibitors. *Journal of Steroid biochemistry and Molecular Biology*, 76; 199-202.

Barria A., Leyton, V., Ojeda, S., Lara, H. E., (1993); Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary síndrome: role of symphatetic innervation. *Endocrinology*, 133:2696-2703.

Baxter J. D., (1997); *Introduction Endocrinology*, Greenspan, F. S.; Strew 1-36.

Benjamin D., Grant E. R., Pohorecky L. A., (1993); Naltrexone reverses ethanol-induced dopamine release in the nucleus accumbens in awake, freely moving rats. *Brain Res*, 621:137-140.

Blum K., Paine J., (1991); Alcohol and the addictive brain. The Free Press. A division of Macmillan, Inc. New York.

Borson W. F., (1993); Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. *Semin Liver Dis* 13: 126-135.

Bozarth M. A., Wise R. A., (1984); Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science*, 224: 516-517.

Brandt, M. E., Puett, D., Zimniski, S. J., (1990); Divergence between ovarian aromatase activity, estrogen and androgen levels in the cycling rat. *Endocrinology* 126, 72-79.

Brawer J. R., Beaudet A., Desjardins G.C., Schipper H. M., (1993); Pathologic effect of estradiol on the hypothalamus. *Biol Reprod*, 49, 647-652.

Brawer J. R., Naftolin F., Martin J., Sonnenschein C., (1978); Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. *Endocrinology*, 103, 501-512.

Brawer J. R., Schipper and Naftolin F., (1980); Ovary-dependent degeneration in the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology*, 107, 274-279.

Brian J. Long, Danijela Jelovac, Venkatesh Handratta, Apinya Thiantanawat, Nicol MacPherson, Joseph Ragaz, Olga G. Goloubeva, Angela M. Brodie., (2004); Therapeutic Strategies Using the Aromatase Inhibitor Letrozole and Tamoxifen in breast cancer model. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 96, No. 6.

Brinton R. D., (2001); Cellular and molecular mechanism of estrogen regulation of memory function and neuroprotection against Alzheimer's disease: recent insights and remaining challenges. *Learning and memory*, 8: 121-133.

Brismar, B.; Bergman, B., (1998); The significance of alcohol for violence and

accidents. *Alcsm.Clin. and Exp. Res.*, 22 (7) 299.

Buzdar A. U., (2003); Pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors. *Clin Cancer Res* 9: 468 S-72S.

Carriere P. D., Farookhi R., Brawer J. R., (1989); The role of aberrant hypothalamic opiate function in generating polycystic ovaries in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 67:896-901.

Chang K-J, Cooper B. R., Hazum E., Cuatrecasas P., (1979); Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol Pharmacol*, 16:91-104.

Chang K-J, Cuatrecasas P., (1981); Heterogeneity and properties of opiate receptors. *Fed Proc*, 40:2729-2734.

Chen CP., Kuhn P., Chaturvedi K., Boyadjieva N. y Sarkar DK. (2006); Ethanol induces apoptotic death of developing beta-endorphin neurons via suppression of cyclic adenosine monophosphate production and activation of transforming growth factor-beta1-linked apoptotic signaling. *Mol Pharmacol. Mar*; 69(3):706-17.

C. Sanchis-Segura, Merce Correa, Carlos M. G. Aragon., (2000); Lesión on the hypothalamic arcuate nucleus by estradiol valerate results in a blockade of ethanol-induced locomotion. *Behavioural Brain Research* 114; 57-63.

Cui Ping Chen, Peter Kuhn, Juan P. Advis and DipakK. Sarkar., (2004); Chronic ethanol consumption impairs the circadian rhythm of pro-opiomelanocortin and period genes mRNA expression in the hypothalamus of the male rat. *Journal of Neurochemistry*, 88, 1547–1554.

Davidson D. Amit Z., (1997); Naltrexone Blocks acquisition of voluntary ethanol intake in rats. *Alcohol Clin Exp res*; 27: 677-83.

Del Río portilla Irma Y., (1996); efecto de la gonadectomía la restitución hormonal en el EEG en ratas hembras y machos. Universidad Nacional Autónoma de México; México, D. F.

Desjardins G. C., Beaudet A. y Brawer J. R., (1990); Alterations in opioide parameters in the hypothalamus of rats with estradiol-induced polycystic ovarian disease. *Endocrinology*, 127, 2969-2976.

Desjardins G. C., Beaudet A., Schipper H. M., y Brawer J. R., (1992); Vitamin E protects hipothalamic beta-endorfinas neurons from estradiol neurotoxicity. *Endocrinology*, 131(5): 2482-2484.

Desjardins G. C., Brawer J. R. y Beaudet., (1993); Estradiol is selective neurotoxic to hypothalamic beta-endorphin neurons. *Endocrinology*, 132, 86-93.

De Waele J. P., Gianoulakis C., (1993); Effects of single and repeated exposures to ethanol on hypothalamic b -endorphin and CRH release by the C57BL/6 and DBA/2 strains of mice. *Neuroendocrinology*, 57:700-709.

De Waele J. P., Papachristou D. N., Gianoulakis C., (1992); the alcohol preferring C57BL/6 mice present an enhanced sensitivity of the hipotalamic b-endorphin system to ethanol than the alcohol-avoiding DBA/2 mice. *J. Pharmacol Exp Ther*, 261:788-794.

Di Chiara G., Acquas E., Tanda G., (1996); Ethanol as a neurochemical surrogate of conventional reinforcers: The dopamine-opioid link. *Alcohol*, 13:13-17.

Dissen G. A., Lara H. E., Leyton V., Paredes A., Hill D., Costa M., Martinez Serrano A., Ojeda S. R., (2000); Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology*, 141: 1073-1082.

Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B., (1998); Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res*. 22 (5): 998-1040.

El-Bassel N., Schilling R. F., Turnbull J. E., Su K. H., (1993); Correlates of alcohol use among methadone patients. *Alcohol Clin Exp Res*, 17: 681-686.

Friedbert Weiss and Linda J. Porrino., (2002); Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction: Recent Advances And Challenges. *The Journal Of Neuroscience*, 22 (9): 3332-3337.

Froehlich J. C.. (1995); Genetic factors in alcohol self-administration. *J Clin Psychiatry*, 56 (supl. 7): 15-23.

Froehlich J. C., Harts J., Lumeng L., Li T. K.. (1990); naloxona attenuates voluntary ethanol intake in rats selectively bred for high ethanol preference. *Pharmacol Biochem Behav*, 35: 385-390.

Frye G. D., Breese G. R., (1981); An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 75:372-379.

Gavaler J. S., Van Thiel D, H., (1992); The association between moderate alcoholic beverage consumption and serum estradiol and testosterone levels in normal postmenopausal women: Relationship to the literature. *Alcoholism: Clin Exp Res*. 16, 87-92.

Gianoulakis C., (2001); Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism. *J Psychiatry Neurosci*, 26:304-318.

Gianoulakis C., (1996); Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: human and basic science studies. *Alcohol Alcohol*; 31: 33-42.

Gianoulakis C., (1993); Endogenous opioids and excessive alcohol consumption. *J. Psychiatry Neurosci*, 18: 148-156.

Gianoulakis C, Beliveau D, Angelogianni P, Meaney M, Thavundayil J, Tawar V, Dumas M., (1989); Different pituitary b-endorphin and adrenal cortisol response to ethanol in individuals with high and low risk for future development of alcoholism. *Life Sci*, 45: 1097-1109.

Gianoulakis C., De Waele J. P., Kiianmaa K., (1992); differences in the brain and pituitary beta-endorphin system between the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 16:453-459.

Goth L, Pay A., (1996); Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis*. 17(8): 1302-3.

Hasan Kafali, Mehmet Iridam, Ilyas Ozardah and Nurettin Demir., (2004); Letrozole-Induced Polycystic Ovaries Disease. *Archives of Medical research*; 35; 103-108.

Hilakivi, C. L., (1996); Role of estradiol in alcohol intake and alcohol-related behaviors. *J. Study Alcohol*, 57 (2):162-170.

Ho A. K., Chen R. C., (1976); Interactions of narcotics, narcotic antagonists and ethanol during acute, chronic, and withdrawal states. *Ann N Y Acad Sci*, 281: 297-310.

Ho Aks, Allen J. P., (1981); Alcohol and the opiate receptor interactions with the endogenous opiates. *Adv Alcohol Subst Abuse*, 1:53-75.

Hoffman P. L., Urwyler S., Tabakoff B., (1982); Alterations in opiate receptor function after chronic ethanol exposure. *J Pharmacol Exp Ther*, 222:182-189.

Hubbell C. L., Czirr S. A., Reid L. D., (1987); Persistence and specificity of small doses of morphine on intake of alcoholic beverages. *Alcohol*; 4: 149-156.

Hunt W. A., (1993); *Neuroscience Research: How has it contributed to our*

understanding of alcohol abuse and alcoholism?. A review: *Alcohol Clin Exp Res*, 17: 1055-1065.

Hutchinson J., (1984); *Androgen Metabolism in the Brain: Neural Correlates*. Unit. On development and integration of behaviour. University Dep. of Animal Behaviour, Cambridge, 23:51-59.

I. Diamond and A. S. Gordon., (1997); *Cellular and molecular Neuroscience of alcoholism*. *Psychological reviews*, Vol 77, 1-20.

I. E. Smith., (1999); *Aromatase inhibitors: a dose-response effect?*. *Endocrine-Related cancer* 6-245-249.

Imperato A., Di Chiarra G., (1986); *Preferential Stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol*. *J Pharmacol Exp. Ther*, 239: 219-228.

Jennifer R. Wood, Velen L. Nelson, Clement Ho, Erik Jansen, Clare Y. Wang, Margrit Urbanek, Jan M. McAllister, Sietse Mosselman, and Jerome F. Strauss III., (2003); *The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis*. *J. Biol. Chem*, 10, 1074/jbc.M300688200.

J. L. Santos M., J. A. Martínez H., F. Pérez B., C. Albala B., (2005); *Genetic Epidemiology of Obesity. Family studies*. *Rev Méd Chile*; 133:349-361.

J. Odum, John Ashby., (2002); *Detection of aromatasa inhibitors in vitro using rat ovary microsomes*. *Toxicology Letters* 129; 119-122.

J. S. Mazana., (2001); *Biomedicina: Inmunología de los opioides*; www.todo-ciencia.com.

Juárez, J., (2001); Cerebro y función endocrina. Neurociencias Cognitivas. Alcaraz, V. y Gumá E. Edit. Manual Moderno, cap. I pp. 1-21.

Juárez, J., Vázquez-Cortés C. and Barrios De Tomasi, E., (2005); Different stages in the temporal course of estrogen treatment produce opposite effects on voluntary alcohol consumption in male rats. *Alcohol*.36(1):55-61.

Juarez, J., Camargo G. y Gómez U., (2006); Effects of estradiol valerate on voluntary alcohol consumption, beta-endorphin content and neuronal population in hypothalamic arcuate nucleus. *Pharmacol Biochem Behav*. 85(1):132-9.

Kalant H., (1996); Pharmacokinetics of ethanol: Absorption, Distribution and Elimination. In: Begleiter H; Kissin B., *The Pharmacology of Alcohol and Alcohol Dependence*. NY, Oxford University Press; pp.15-58.

Kalra S. P., (1993); Mandatory neuropéptido-steroid Signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrine Reviews* 14- 507-537.

Kalra S. P., Allen L.G., Sahu A., Kalra P. S., Crowley W. R., (1988); Gonadal-Steroid and neuropeptide Y-opioid-LHRH axis: interactions and diversities. *J Steroid Biochem* 30:185-193.

Knobil E., Plant T., Wildt L., Belchetz P. E., Marshall G., (1980); Neuroendocrine control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive rol of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 207: 1371-1376.

Kubli C., (1993); Acción neuromoduladora de las hormonas esteroides. En Zarate T. A., Moranva, Feria V. C., Kubli C., *Fundamentos de neuroendocrinología*. Biblioteca de la salud. Secretaría de Salud y Fondo de Cultura Económica.

Lamb H. M., Adkins J. C., (1998); Letrozole. A review of its use in postmenopausal women with advanced breast cancer. *Drugs*. 56 (6): 1125-40.

Lara H. E., G.A. Dissen, V. Leyton, A. Paredes, H. Fuenzalida, J. L. Fiedler and S. R. Ojeda., (2000); An increased intraovarian síntesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal componet of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* Vol. 141, No. 3- 1059-1072.

Lara H. E., Ferruz J. L., Luza S., Bustamante D. A., Borges, Ojeda S. R., (1993); Activación of ovarian simpathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133:2690-2696.

Lawrence Woo, Oliver B. Sutcliffe, Christian Bubert, Anna Grasso, Surinder K. Chander, Atul Purohit, Michael J. Reed, and Barry V. L. Potter., (2003); First Dual Aromatase-Steroid Sulfatase Inhibitors. *J. Med. Chem* 46, 3293-3196.

Ligibel J. A., Winer E. P., (2003); Clinical differences among the Aromatase Inhibitors. *Clin Cancer Res* 9: 473S-9S.

Liu X. D., Xie L., Zhong Y., Li C..X., (2000); Gender difference in letrozole pharmacokinetics in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 21(8):680-4.

Lukas S. E., Mendelson J. H., (1988); Electroencephalographic activity and plasma ACTH during ethanol-induced euphoria. *Biol Psychiatry*, 2923: 141-148.

Luquín, S., (1995); Hormonas gonadales y plasticidad neuroglial en la rata adulta. *Universidad Complutense, Madrid Esp*. pp 4-6.

Manneras L., Cajander S., Holmång A., Seleskovic Z., Listig T., Lönn M. y Stener-Victorin E., (2007); A new rat model eshibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* Aug; 148(8): 3781-91.

Marinelli, P. W., Kiianmaa K., Gianoulakis C., (2000); Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sciences*, Vol. 66, No. 20: 1915-1927.

Marinelli, P. W., Quirion, R., Gianoulakis, C., (2003); Estradiol valerate and alcohol intake: a comparison between Wistar and Lewis rats and the putative role of endorphins. *Behavioural brain research*, 139: 59-67.

Matthew J., Smith N. D., Lotear Jennes., (2001); Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122, 1-10.

Méndez E. G., Barrón V. J., Hernández B. M. C., Kably A. A., (1997); Inducción de un modelo murino de síndrome de ovarios poliquísticos: valoración laparoscópica, histológica y endocrina. Utilidad clínica. *An Med Asoc Med Hosp. ABC*; 42 (4): 130-135.

Mitchell V., Prevot V, Jennes L., Aubert JP., Croix D. and Beauvillain J. C., (1997); Presence of mu and kappa opioid receptors in galanin but not in GnRH neurons in the female rat. *Neuroreport* 8- 3167-3172.

Myers R. D., Borg S., Mossberg R., (1986); Antagonism by naltrexone of voluntary alcohol selection in the chronically drinking macaque monkey. *Alcohol*, 3: 383-399.

Nomelí P. Núñez, Danijela Jelovac, Luciana Macedo, David Berrigan, Susan N. Perkins, Stephen D. Hursting, J. Carl Barreto and Angela Brodie., (2004); Effects of the antiestrogen Tamoxifen and the Aromatase Inhibitor Letrozole on Serum and Bone Characteristics in a preclinical Tumor Model for Breast Cancer. *Clinical cancer research* Vol. 10, 5375-5380.

Noth R. H., Walter R. M. Jr., (1984); The effects of ethanol on the endocrine system. *Med Clin North Am*, 68: 133-146.

Nutt D., (1999); Alcohol and the brain. Pharmacological insights for psychiatrists. *Br J Psychiatry*. 175: 114-9.

O'Malley S. S., Jaffe A. J., Chang G., Schottenfeld R. S., Meyer R. E., Rounsaville B., (1992); Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence: a controlled study. *Arch Gen Psychiatry*, 49: 881-888.

Paredes A., Galvez A., Leyton V., Aravena G., Fiedler J. L, Bustamante D., Lara H. E., (1998); Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine*; 8 (3): 309-15.

Patel V. A., Pohorecky L. A., (1989); Acute and chronic ethanol treatment on beta-endorphin and catecholamine levels. *Alcohol*, 6: 59-63.

Petersen DR, Erwin VG, Deitrich RA. (1983); Brain acetaldehyde metabolism during ethanol consumption. *Res. Monographs* 9: 93-9.

Pohorecky L. A., (1991); Stress and alcohol interaction: an update of human research. *Alcohol Clin Exp Res*, 15: 438-459.

Qulali, M.; Crabb, D. W., (1992); Estradiol regulates class I alcohol dehydrogenase gene expression in renal medulla of male rats by post-transcriptional mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 277-284.

Qulali, M.; Ross, R. A.; Crabb, D. W., (1991); Estradiol induces class I alcohol dehydrogenase activity and mRNA in kidney of female rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 406-413.

Rachamin, G.; MacDonald, J. A.; Wahid S.; Clapp J.; Khanna, J M.; Israel, J., (1980); Modulation of Alcohol Dehydrogenase and Ethanol Metabolism By Sex Hormones in

the Spontaneously Hypertensive Rat. *Biochem. J.* 186:483-490.

Ramos J., (2001); Diferencias sexuales en el cerebro: Relación entre conducta, anatomía y función. Tomado del texto de Neurociencias Cognitivas. Alcaraz, V. y Gumá E. Edit. Manual Moderno, cap. II pp. 23-47.

Rasmussen D. D., Bryant C. A., Boldt B. M., (1998); Acute alcohol effects on opiomelanocortinergic regulation. *Alcohol Clin Exp Res*; 22: 789-801.

Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G. I., (1994); Reisine T: Pharmacological characterization of the cloned κ , δ , and m opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 45:330-334.

R. Eshet, G Maor, T Ben Ari, M Ben Eliezer, G Gat-Yablonski, and M Philip., (2004); The aromatase inhibitor letrozole increases epiphyseal growth plate height and tibial length in peripubertal male mice. *Journal of Endocrinology*, Vol 182, Issue 1, 165-172.

Reid L. D., Hunter G. A., (1984); Morphine and naloxone modulate intake of ethanol. *Alcohol*, 1: 33-37.

Reid M. L., Hubbell C. L., y Reid L. D., (2003); A pharmacological dose of estradiol can enhance appetites for alcoholic beverages, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 74:381- 388.

Reid L.D., Marinelli, P.W., Shannon, M. B., Fiscale, L. T., Narciso, S. P., Oparowski, Ch. J., Reid, M. L., Merrigan, B. A., Moricone, J., Hubbel, Ch. L., Gianoulakis, C., (2002); One injection of estradiol valerate induces dramatic changes in rats intake of alcoholic beverages. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 72, 601-616.

Ross, H.E., Glaser, F.B. & Germanson, T., (1988); The prevalence of psychiatric disorders in patients with alcohol and other drug problems. *Arch. Gen. Psychiatry* 45 : 1023-1031.

Roth-Deri L, Mayan R. y Yadid G. (2006); A hypothalamic endorphinic lesion attenuates acquisition of cocaine self-administration in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16(1): 25-32.

Schipper H. M., Brawer J. R., Nelson J. F., Felicio L. S., Finch C. E., (1981); Role of the gonads in the histologic aging of the hypothalamic arcuate nucleus. *Biol Reprod.* Sep;25(2):413-9.

Schipper H. M., Lechan R. M., Reichlin S., (1990); Glial peroxidase activity in the hypothalamic arcuate nucleus effects of estradiol valerate-induced persistent estrus. *Brain Res.* 507:200-207.

Schipper H. M., Mateescu-Cantuniari A., (1991); Identification of peroxidase-positive astrocytes by combined histochemical and immunolabeling techniques in situ and in cell culture. *J Histochem Cytochem.* 39: 1009-1016.

Schuckit, M. A., (2000); *Drug and alcohol Abuse.* NY Kluwe Academic/Plenum Publishers; 317.

Seizinger B. R., Bovermann K., Holtt V., Herz A., (1984); Enhanced activity of the b-endorphinergic system in the anterior and neurointermediate lobe of the rat pituitary after chronic treatment with ethanol liquid diet. *J Pharmacol Exp Ther,* 230:455-461.

Shippenberg T. S., Herz A., Spanagel R., Bals-Kubik R., Stein C., (1992); Conditioning Of Opioid reinforcement: neuroanatomical and neurochemical substrates. *Ann NY Acad Sci,* 654: 347-356.

Shotaro Suzuki and Robert J. Handa., (2004); regulation of estrogen receptor- β expression in the female rat hypothalamus: differential effects of dexamethasone and estradiol. *Endocrinology* 145(8) 3658-3670.

S. M. Luza, L. Lizama, R. A. Burgos, and H. E. Lara., (1995); Hypothalamic Changes in Norepinephrine release in rats with estradiol valerate-induced polycystic ovaries. *Biology of Reproduction*; 52, 398-404.

Stener-Victorin E. y Lindholm C., (2004); Immunity and beta-endorphin concentrations in hypothalamus and plasma in rats with steroid-induced polycystic ovaries: effect of low-frequency electroacupuncture. *Biol Reprod Feb*; 70 (2): 329-33.

Stocco C. (2008); Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. *Steroids May*; 73(5):473-87.

Strother W. N., Chernet E. J., Lumeng L., Li TK., McBride W. J., (2001); Regional central nervous system densities of delta-opioid receptors in alcohol-preferring P, alcohol-nonpreferring NP and Unselected Wistar Rats. *Alcohol* 25: 31-38.

Stubbs C. D., Slater S. J., (1999); Ethanol and protein kinase C. *Alcohol Clin Exp Res*. 23(9): 1552-60.

Tabakoff B., Hoffman P. L., (1983); Alcohol interactions with brain opiate receptors. *Life Sci*, 32:197-204.

Takahashi K., Bergström M., Frändberg P., Vesström EL., Watanabe Y., y Langström B., (2006); Imaging of aromatase distribution en rat and rhesus monkey brains with (11C) vorozole. *Nucl Med Biol Jul*; 33 (5): 599-605.

Terenius, L., (1996); Alcohol addiction (alcoholism) and the opioid System. *Alcohol*, 13(1), 31-34. Review.

Tomkins, D. M. y Sellers, E. M., (2001); Addiction and the brain : the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. *Canadian Medical Association Journal*, 164, 817-821.

Tsou K., Khachaturian H., Akil H., Watson S. J., (1986); Immunocytochemical localization of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the adult rat spinal cord. *Brain Res*; 378: 28-35.

Ulm R. R., Volpicelli J. R., Volpicelli L. A., (1995); Opiates and alcohol self-administration in animals. *J. Clin Psychiatry*, 56 (spl. 7): 5-14.

Valenzuela, L., (2006); Participación de los estrógenos en la citotoxicidad producida por el valerato de estradiol en neuronas β -endorfinérgicas y en el consumo de alcohol en la rata hembra. Universidad de Guadalajara, Jalisco, México

Van Ree J. M., Niesink R. J., Van Wolfswinkel L., Ramsey N. F., Kornet M. M., Van Furth W. R., Vanderschuren L. J., Gerrits M. A., Van den Berg C. L., (2000); Endogenous opioids and reward. *Eur J Pharmacol.* 405(1-3):89-101. Review.

Van Wolfswinkel L., Van Ree J. M., (1985); differential effect of naloxone on food and self-stimulation rewarded acquisition of a behavioral response pattern. *Pharmacol Biochem Behav*, 23: 199-202.

Virgen M., (2002); Efecto de los estrógenos sobre los patrones de consumo de alcohol en la rata macho. Instituto de neurociencias, Universidad de Guadalajara.

Volpicelli J. R., Alterman A. I., Hayashida M., O'Brien C. P., (1992); Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry*, 49: 876-880.

Volpicelli JR, Ulm RR, Hopson N., (1991); Alcohol dinking in rats during and following morphine injections. *Alcohol*, 8: 289-292.

Wardlaw S. L., Wang P. J., Frantz A. G., (1985); Regulation of beta-endorphin and ACTH in brain by estradiol. *Life Sci*, 37, 1941-1947.

Wild K. D., Reid L. D., (1990); Modulation of ethanol-intake by morphine evidence for a central site of action. *Life Sci*, 47: PL49-PL54.

Windle, M., Windle, R.C., Scheidt, D.M., (1995); Physical and sexual abuse and associated mental disorders among alcoholic inpatients. *Am. J. Psychiatry* 152 : 1322-1328.

Wise R. A., (1980); Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol Biochem Behav*, 13 (supl. 1): 213-223.

Wise R. A., Bozarth M. A., (1987); A psychomotor Stimulant theory of Addiction. *Psychol Rev*, 94: 469-492.

A N E X O S