



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas
Departamento de Ciencias Ambientales

Instituto de Neurociencias

PARTICIPACIÓN DE LOS ESTRÓGENOS EN LA CITOTOXICIDAD PRODUCIDA
POR EL VALERATO DE ESTRADIOL EN NEURONAS B-ENDORFINÉRGICAS Y
EN EL CONSUMO DE ALCOHOL EN LA RATA HEMBRA.

Tesis

Que para obtener el grado

MAESTRO EN CIENCIAS DEL COMPORTAMIENTO

(Opción Neurociencias)

presenta

Lucía Valenzuela Salazar

Comité Tutelar y Sinodales

Dr. Jorge Juárez González (Director)

Dra. Marisela Hernández González

Mtro. Sergio Meneses Ortega

Dr. Ulises A. Gómez Pinedo (Asesor)

Dra. Julieta Ramos Loyo

Guadalajara, Jalisco

Enero de 2006

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. Marisela Hernández y al Mtro. Sergio Meneses, por sus valiosas aportaciones y asesorías oportunas como miembros 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.

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

A Dios por permitirme encontrar el camino hacia esta fascinante área de estudio.

A mis compañeros de generación por compartir tantos momentos en este trayecto en nuestras vidas.

Al Hombre con quien quiero compartir mi vida, y quien me da día a día la fuerza para seguir adelante, te amo Juan Antonio Cao Romero Pino.

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

Gracias.

INDICE	
ABREVIATURAS	I
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
1. ALCOHOL Y ALCOHOLISMO	6
1.1. METABOLISMO DEL ALCOHOL	9
1.2 FARMACOLOGÍA DEL ALCOHOL	15
1.3. FENÓMENOS NEUROADAPTATIVOS:	
TOLERANCIA Y ABSTINENCIA	18
1.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ETANOL	19
1.4.1. MECANISMOS MOLECULARES	20
1.4.2. MECANISMOS CELULARES	21
1.4.3. CIRCUITOS CEREBRALES	
DE RECOMPENSA	22
1.4.4. NEUROTRANSMISORES IMPLICADOS	
EN LAS ACCIONES REFORZADORAS	
DEL ETANOL	24
2. SISTEMA OPIOIDE	25
2.1. ALCOHOL Y OPIOIDES	27
3. SISTEMA ENDOCRINO	33
3.1 DEFINICIÓN DE LAS HORMONAS	38
3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS HORMONAS	39
3.3 SÍNTESIS Y SECRECIÓN HORMONAL	40
3.4. EFECTOS DE LAS HORMONAS	41
3.5 RECEPTORES HORMONALES	43
3.6 ESTEROIDES	44

3.7 ESTRÓGENOS	48
3.8 RECEPTORES ESTROGÉNICOS	50
3.9 TRANSPORTE DE LOS ESTRÓGENOS EN EL ORGANISMO	51
3.10 CICLOS ENDOCRINOS	52
3.11 CICLO ESTRAL DE LA RATA	52
4. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS	53
5. INHIBIDORES DE AROMATASA	57
6. VALERATO DE ESTRADIOL (VE) Y EFECTOS SOBRE EL HIPOTALÁMO	62
5.1. CIRCUITO NEURONAL AFECTADO POR EL VALERATO DE ESTRADIOL.	71
5.2. OVARIOS POLIQUÍSTICOS COMO MECANISMO MEDIADOR EN EL PROCESO DE CITOTOXICIDAD POR EL VE.	73
5.3. RELACIÓN ENTRE EL DECREMENTO CENTRAL DE B-ENDORFINAS CAUSADO POR EL VE Y CONSUMO DE ALCOHOL.	79
7. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	86
8. OBJETIVOS	88
9. HIPÓTESIS	89
10. MÉTODOS	90
10.1. SUJETOS	90
10.2. CONDICIONES DE LABORATORIO	90
10.3. ASIGNACIÓN DE LOS SUJETOS A LOS GRUPOS	90
11. VARIABLES INDEPENDIENTES	91
12. VARIABLES DEPENDIENTES	91
13. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS	91

13.1. INDUCCIÓN AL ALCOHOL	91
13.2. LÍNEA BASE	92
13.3. PESO, AGUA Y ALIMENTO	92
13.4. TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS	92
13.5. TRATAMIENTO CON LETROZOL	92
13.6. POST-TRATAMIENTO CON ALCOHOL	93
13. 7. CITOLOGÍA VAGINAL	93
13. 8. CUANTIFICACIÓN DE NIVELES DE ESTRÓGENOS Y ANDRÓGENOS EN PLASMA.	93
10.4.11. ESTUDIOS CUALITATIVOS DE OVARIOS	95
10.4.12. PERFUSIÓN	95
10.4.13. CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS INMUNOREACTIVAS A B-ENDORFINAS (B-END)	96
10. RESULTADOS	98
11. DISCUSIÓN	111
12. CONCLUSIONES	121
13. REFERENCIAS	123

ABREVIATURAS

VE	Valerato de estradiol
NAH	Núcleo Arcuato Hipotalámico
LB	Línea Base
VH	Vehículo
E2	Estradiol
T	Testosterona
POMC	Proopiomelanocortina
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
H ₂ O ₂	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
RNA _m	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

RESUMEN:

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 arcuato 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. Se ha postulado que los estrógenos endógenos ováricos median este proceso de citotoxicidad, ya que las hembras ovariectomizadas no muestran esta lesión hipotalámica. Con el fin de estudiar la participación de dicho esteroide gonadal en el efecto que produce el VE en el número de neuronas inmunoreactivas β -end y en el consumo de alcohol, utilizamos 2 grupos de ratas hembras Wistar adultas intactas. Evaluados los niveles basales (LB) del consumo de alcohol, cada hembra fue tratada con 2mg de VE/dosis única. Tres semanas después de esta inyección de VE, un grupo recibió s.c. 250 μ g/kg/día/9 semanas del inhibidor de aromatasa Letrozol (LTZ), y el otro grupo fue tratado con vehículo (VH) en el mismo periodo de 9 semanas. Recolectamos 5 muestras sanguíneas en cinco intervalos para monitorear variaciones en niveles de estradiol (E2) y testosterona (T), empleando análisis inmunoenzimáticos en plasma. El consumo voluntario de alcohol fue reiniciado a partir de la segunda semana con LTZ o VH continuando hasta la semana 9. El VE redujo dramáticamente el número de neuronas β -end en el grupo VE+VH, decrementó el consumo de alimento y peso, provocó estro continuo en las hembras y ovarios poliquísticos; sin embargo no afectó el consumo de alcohol, ya que dicho consumo decrementó paulatinamente en el tiempo independientemente del tratamiento con LTZ o VH. De esta manera las semanas 8, 9 y 10 fueron significativamente menores a la semana 1. El consumo de alcohol no tuvo ningún efecto atribuible al VE. El LTZ inhibió significativamente la citotoxicidad por el VE, incrementó la T significativamente, la reducción de E2 fue mínima, disminuyó los efectos del VE a nivel de ovarios, además, produjo un incremento notable en el peso corporal en relación al grupo VH, consecuencia atribuible a la privación de estrógenos, sin embargo, el consumo de alcohol tampoco fue afectado con la privación farmacológica de estrógenos. Conclusiones: El incremento en el consumo de alcohol esperado con el VE no es apoyado en este estudio, a pesar de la reducción significativa en el número de neuronas β -end. La inhibición estrogénica a través de un inhibidor de aromatasa no altera dicho consumo, pero sí minimiza los efectos centrales y periféricos ocasionados por el VE. Atribuimos el que no se haya incrementado el consumo de etanol a variaciones metodológicas de exposición post-VE, ya que se suspendió el consumo por 4 semanas, después de haber expuesto a los sujetos diariamente al consumo durante la inducción y la LB, y además consideramos la posibilidad de que sea necesario emplear dosis mayores para inhibir de manera más evidente la biosíntesis estrogénica por el ovario.

ABSTRACT

It has been reported that a single dose of estradiol valerate (EV) (2mg) to female rats with intact ovaries produces a cytotoxicity in the hypothalamic arcuate nucleus (HAN), a reduction in the number of secretory neurons of β -endorphins (β -end) and consequently of this peptide 60 days after its administration. The dependence to the alcohol has been related with a deficiency of β -end and it has been observed that in this cytotoxicity model the subjects increase the consumptions of alcohol. It has been postulated that the ovarian endogenous estrogens mediates this cytotoxicity process, since the ovariectomized females does not show this hypothalamic lesion. With the purpose of studying the participation of this gonadal steroid in the effect that produces the EV in the number of β -end-immunoreactive neurons and in the consumption of alcohol, two groups of intact mature Wistar female rats were used. After assessing the basal levels (BL) of the consumption of alcohol, each female was treated with 2mg of the single dose of EV. Three weeks after this injection of EV, a group received s.c. 250 μ g/kg/day/9 weeks of the aromatasa inhibitor letrozol (ltz), and the other group was treated with vehicle (vh) in the same period of 9 weeks. We gather 5 blood samples in five intervals to assess variations in estradiol levels (E2) and testosterone (T), using inmunoenzimatic analysis. The voluntary consumption of alcohol was restarted from the second week with ltz or vh continuing until the week 9. The EV reduced dramatically the number of neurons β -end in the group EV+vh, decreased the food consumption and weight, caused continuous estrous in the females and polycystic ovaries; however it didn't affect the consumption of alcohol, since this consumption diminishes gradually in the time regardless of the treatment with ltz or vh. This way the weeks 8, 9 and 10 were significantly smaller than week 1. The consumption of alcohol didn't have any effect attributable to the EV. The ltz inhibited significantly the cytotoxicity produced by EV; the T increased significantly, the reduction of E2 was minimum and diminished the effects of the EV on ovary. At the same time ltz produced a remarkable increment in the corporal weight in relation to the vh group, probably depending on the estrogen deprivation, however, the consumption of alcohol was not affected with the pharmacological deprivation of estrogens. Conclusions: the hypothesized increment in the alcohol consumption with the EV it is not supported in this study, in spite of the significant reduction in the number of β -end neurons. The estrogenic inhibition by an aromatase inhibitor doesn't alter this consumption, but minimizes the central and peripherals effects caused by the EV. We attribute that the consumption of ethanol was not increased due to methodological variations of alcohol exposure post-EV, since the consumption was interrupted by 4 weeks, after the daily exposure during induction and the BL periods. We also consider the possibility that it is necessary to use higher dose to inhibit in a greater extent the estrogenic biosynthesis from the ovary.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho innegable el que el alcohol y la dependencia que se desarrolla hacia esta droga de fácil acceso, representan actualmente un grave problema de salud, social y hasta económico a nivel mundial. El alcoholismo es considerado como el más expandido tipo de adicción, y afecta cada vez más a personas de cualquier edad, raza o género influyendo negativamente en las relaciones familiares, sociales y laborales del paciente.

Últimamente ha crecido el interés por comprender los mecanismos neurofisiológicos que participan en el reforzamiento de la conducta adictiva. Hasta ahora, se atribuye su origen a múltiples factores, entre los cuales cabe citar a los sociales, culturales, bioquímicos, genéticos, metabólicos, de estrés, etc., es decir se plantea una etiología multifactorial (Gianoulakis y col., 2004; Marinelli y col., 2003). Diversas investigaciones centradas en la predisposición genética hacia el alcoholismo, hechas en gemelos y sujetos en adopción, han logrado demostrar que efectivamente los factores genéticos participan en el desarrollo del trastorno (Gianoulakis 2004), además los estudios realizados con líneas de animales con alta o baja preferencia hacia el consumo de alcohol, apoyan esta teoría (Marinelli y col., 2000).

El presente proyecto forma parte de las incógnitas que nuestro laboratorio se ha planteado con el propósito de aumentar los conocimientos acerca de aquellos mecanismos de índole neurofisiológica que subyacen a la conducta adictiva, específicamente al alcoholismo. Consideramos muy importante la relación entre dos sistemas: el sistema endocrino y el sistema opioide, en el desarrollo de las adicciones.

Reid y col., (2002), indica que entre los sistemas de neurotransmisión propuestos como importantes en el control de la conducta de búsqueda de alcohol, destaca el sistema opioide. Gianoulakis (2001; 1989), en sus investigaciones experimentales

en sujetos animales y en humanos menciona que el sistema opioide endógeno juega un rol prominente en el mantenimiento de la conducta de beber y además contribuye desde el punto de vista genético a una mayor predisposición de la dependencia. Genazanni y col., (1982), encuentran que los sujetos adictos al alcohol, presentan niveles de β -endorfinas en líquido cefalorraquídeo menores a sujetos voluntarios no alcohólicos, después de un periodo de desintoxicación. Lo cual sugiere que la adicción al alcohol se relaciona con alteraciones en la producción de péptidos opioides derivados de la POMC.

Así mismo, el hecho de que el alcohol sea capaz de estimular la liberación de péptidos opioides como las β -endorfinas, que al ser liberados en regiones cerebrales relacionadas con circuitos de recompensa cerebral, hace pensar que este sistema participa de manera importante en el mantenimiento de consumos elevados de esta droga (Koob, 1996). Los péptidos opioides están estrechamente relacionados con un sin número de procesos adaptativos y fisiológicos, como lo son la analgesia, respuesta al estrés, recompensa, procesos motivacionales, temperatura corporal e ingesta. Actúan a nivel nervioso como moduladores o neurotransmisores (Herz, 1997). Las áreas cerebrales en las cuales se realiza la biosíntesis de β -endorfinas son hipófisis y núcleo arcuato hipotalámico y se ha observado que el factor liberador de corticotropina induce su liberación en ambas áreas.

Otro sistema que se ve afectado por el etanol, es el sistema endocrino. Las dos principales vertientes para estudiar la interacción del alcohol con las hormonas son: relacionando los efectos del alcohol sobre las hormonas o estudiando los efectos de éstas sobre el consumo del alcohol (Juárez y col., 2002).

Las hormonas responsables de la regulación del eje hipotálamo hipófisis-gónadas, son esenciales para la propia función reproductiva y ha sido mostrado que el etanol ejerce sus efectos en los tres niveles del eje. Al respecto se ha hallado que la ingesta de alcohol repercute directamente sobre los niveles de hormonas

circulantes (Hilakivi, 1996). Por ejemplo se ha reportado que cuando mujeres posmenopáusicas son bebedoras habituales, los niveles de estrógenos se incrementan y los de testosterona se reducen (Gavaler y col., 1992).

Si el alcohol es administrado de forma aguda, ocurren alteraciones en hormonas como la prolactina, la hormona del crecimiento, la hormona adrenocorticotropa y cortisol (Emanuele y Emanuele, 1997), cuando esto ocurre se observan algunos trastornos en ambos sexos, como irregularidad del ciclo menstrual, aumenta el riesgo de abortos así como de padecer cáncer de mama y llega a provocar menopausia precoz, entre muchos otros. En el varón puede observarse un decremento tanto en la producción como en la motilidad de los espermatozoides, ya que ejerce efectos directos en los testículos, inclusive es capaz de desencadenar feminismo como secuela de los cambios de hormonas circulantes que provoca el consumo crónico del alcohol (Ruusa y col., 1997; Villalta y col., 1997). En contraste, hay pocos estudios dirigidos a manipular y controlar los niveles hormonales, para observar su repercusión sobre la ingesta de etanol.

Los estrógenos ejercen efectos diversos sobre el sistema opioide y por ende sobre el consumo de alcohol. Por ejemplo se ha encontrado que los estrógenos decrementan los niveles de β -endorfinas en hipotálamo (Desajardins y col., 1993; Lapchack, 1991; Schipper y col., 1994; Wardlaw 1985), incrementan la internalización de receptores a opioides (Sinchak K., y Micevych P., 2003) y entonces produce un decremento en el número de receptores disponibles. Otros investigadores han encontrado que el tratamiento con estrógenos a ratas ovariectomizadas con preferencia por el alcohol, al inicio reduce los consumos (Almeida y col., 1998; Sandberg y col., 1982; Sandberg y Steward, 1982), restableciendo los niveles de línea base después de aproximadamente dos semanas de tratamiento continuo (Sandberg y col., 1982; Sandberg y Steward, 1982).

El Valerato de Estradiol (VE) es una preparación que libera estradiol por un periodo de 12 a 20 días y que es capaz de desarrollar en la rata hembra intacta, ovarios poliquísticos y reducción en el número de neuronas β -endorfinérgicas en el arcuato hipotalámico, hasta de un 60%, y por ende en los niveles de β -endorfinas. Este procedimiento nos proporciona un modelo único para estudiar la relación entre hormonas, péptidos opioides y consumo de alcohol en animales. Además esto plantea una problemática realmente importante ya que en la actualidad se emplea la terapia de reemplazo hormonal de manera frecuente y precisamente a través de este tipo de fármaco cuya acción es de depósito o liberación prolongada.

Reid y col., (2002), describe que en ratas con oportunidad continua para beber alcohol, a las cuales les son aplicadas dosis farmacológicas de estradiol (VE), es posible detectar que durante los primeros días post-VE, el consumo de bebidas alcohólicas endulzadas se reduce dramáticamente, con el subsecuente regreso al consumo equivalente a los niveles de la línea base. Si los sujetos tratados con VE tienen la oportunidad de beber alcohol por un tiempo prolongado, estos beben una mayor cantidad que los sujetos control. Así también cuando el VE es administrado 15 y 31 días previos a la primera oportunidad para beber alcohol, los sujetos incrementan su significativamente el consumo en relación al grupo control. Al comparar niveles de β -endorfinas no se encuentran diferencias significativas. Sin embargo diversas investigaciones señalan que sujetos catalogados como bebedores fuertes, presentan bajos niveles de β -end.

Por su parte Camargo y col., (2005), encuentran que tras esta misma manipulación experimental, los sujetos expuestos de manera continua al consumo voluntario de etanol, incrementan significativamente dicho consumo en las semanas 4 y 5 posteriores al VE.

El mecanismo a través del cual el VE es capaz de desencadenar la reducción en neuronas β -endofinérgicas 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, por ello, el presente proyecto pretende determinar si son los estrógenos endógenos los mediadores de dicha citotoxicidad, así mismo, analiza si los péptidos opioides actúan como sustrato neural en el comportamiento de un alto consumo del alcohol, específicamente el rol de la β -endorfinas como componentes de los mecanismos de reforzamiento del alcohol.

ANETECEDENTES

ALCOHOL Y ALCOHOLISMO

El consumo permitido y socialmente aceptado del alcohol etílico o etanol, sustancia de abuso utilizada en la mayor parte de las culturas y épocas y tóxico más universalmente consumido, origina una problemática que, en el caso de abuso en su consumo trasciende a lo social, sanitario, laboral y familiar. 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. Con anterioridad era considerada un síntoma de estrés emocional y psicológico o en algunos casos como un comportamiento aprendido e inadaptado. En el mundo es la cuarta causa de incapacidad. 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.* El alcoholismo es definido por la Organización Mundial de la Salud como la ingesta diaria de alcohol superior a 50 gramos en la mujer y 70 gramos en el hombre (un cuarto de litro de vino de 30 gramos y un cuarto de cerveza de 15 gramos).

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 W. y Linda J., 2002).

Las condiciones desencadenantes de un consumo excesivo de alcohol en algunos individuos y no en otros, son complejas, debido a que éstas involucran interacciones entre factores genéticos, psicosociales, ambientales y factores neurobiológicos. Particularmente el alcoholismo es un factor multigénico. Los modelos animales, incluyendo modelos genéticos de alcoholismo, e investigaciones genéticas sofisticadas son algunas de las estrategias que se han dirigido a esta cuestión específica.

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.

Los especialistas que abordan este problema, desarrollan modelos de experimentación, en los cuales se expone al consumo crónico de alcohol a los sujetos animales, con la finalidad de estudiar factores neuronales, químicos, etc., que median los efectos reforzantes que produce el etanol. 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, cada vez mayor, al alcohol y

enfermedades asociadas a su consumo. El alcohol penetra todos los tejidos del cuerpo y afecta funciones vitales, ya que es una molécula pequeña hidrófila y liposoluble. El hígado es el órgano que se ve más severamente afectado por el alcoholismo.

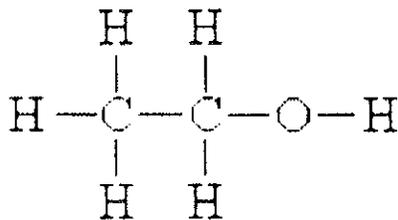
El efecto temprano de tipo estimulante se debe a la depresión de la inhibición cerebral, mientras que los efectos tardíos son el resultado de una depresión más generalizada de otras funciones. El alcohol afecta los reflejos simples y complejos, las reacciones de asociación libre, la memoria y la coordinación 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.

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. 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: la 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, stress, etc.

El consumo de alcohol puede ser significativamente afectado por esquemas de reforzamiento y/o por asociación con otros reforzadores; son de igual importancia los factores farmacogenéticos. El abuso consiste en el consumo de alcohol en

circunstancias peligrosas (mientras se conduce, p.ej.). La dependencia es definida como el uso excesivo de etanol que suele llevar a trastornos mentales específicos como intoxicación alcohólica, síndrome de abstinencia (a veces delirium), alucinosis, trastorno mnésico, demencia, encefalopatía de Wernicke y demencia tipo Korsakoff (Donovan, 1986). Varios estudios sugieren que las alteraciones neurológicas relacionadas por el alcohol pueden ser causadas por una combinación de efectos neurotóxicos del etanol o sus metabolitos, factores nutricionales y predisposición genética.

METABOLISMO DEL ALCOHOL



La estructura molecular del alcohol etílico se compone de carbono, hidrógeno y oxígeno:
CH₃CH₂OH.

El alcohol se obtiene por fermentación de azúcares, por destilación de la madrea, etc., y es usado como bebida, medicamento, perfume, limpiador, etc., se acompaña de otros componentes (aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, taninos, colorantes, y sustancias con efectos farmacológicos) que le confieren sus cualidades.

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. Respecto a su distribución, el alcohol llega a todo el organismo por lo que su volumen de distribución es de 42 litros, que es +/- la cantidad de agua que hay en el organismo. El alcohol no se fija a ningún tejido ni se une a las proteínas del plasma y pasa fácilmente la barrera hemato-encefálica y la placentaria.

El alcohol se elimina principalmente por biotransformación a nivel del hígado, el 90% del alcohol es biotransformado en este órgano, y el otro 10% es biotransformado en otros tejidos como el corazón, cerebro y pulmón, siendo una pequeña parte excretado como tal por el sudor y orina (Wiberg G. S. y col., 1971).

La principal vía de biotransformación es a través de la alcoholdehidrogenasa (ADH), que es una enzima citosólica que trabaja con NAD (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido) el cual transforma a NADH (aldehído deshidrogenasa hepática). Este sistema se satura rápidamente con el alcohol cuando la cantidad de alcohol que se ingiere es muy alta. 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.

Una segunda vía pero de importancia menor, es el sistema microsomal, en este caso se denomina MEOS por Microsomal Hepato Oxidation Sistem, y este sistema como todo sistema microsomal requiere de NADPH que se transforma en NADP y existe consumo de oxígeno. Este sistema microsomal se induce por el consumo crónico de alcohol, por lo tanto, adquiere importancia cuando el consumo de alcohol es crónico o cuando la ingesta es muy alta (Qulali y Crabb, 1992; Qulali y col., 1991; Rachamin y col., 1980 y; Techke y Heymman, 1982). Este sistema enzimático es miembro de la familia de los citocromos microsomales P450, y la denominación actual más extendida para este sistema es P450 CYP2E1, que corresponde a la proteína purificada.

Un tercer sistema es el sistema de la catalasa el que sólo adquiere importancia cuando la ingesta de alcohol es muy alta. 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. La catalasa es uno de los más activos catalizadores producidos por la naturaleza. Es única entre las enzimas que degradan H_2O_2 porque lo hace de una manera muy eficiente energéticamente por ello se ha propuesto como sistema regulador de la homeostasis de peróxido de hidrógeno en la célula.

No importa la cantidad que haya sido consumida, el hígado sólo puede metabolizar cierta cantidad de alcohol por hora. La velocidad del metabolismo del alcohol depende parcialmente de la cantidad de enzimas metabolizantes en el hígado que varía entre las personas y en general, después de la ingestión de una bebida normal la cantidad de alcohol de la sangre del bebedor alcanza su punto máximo entre 30 y 45 minutos.

El alcohol se metaboliza más lentamente de lo que se absorbe. Ya que el metabolismo del alcohol es lento, la ingestión se tiene que controlar para evitar que se acumule en el cuerpo y cause embriaguez. Un gran número de factores influye sobre el proceso de la absorción, como la presencia de comida y el tipo de comida dentro de las vías gastrointestinales cuando se consume alcohol. La velocidad a la cual se absorbe el alcohol depende de lo rápido que el estómago vacía su contenido al intestino. Cuanto más alto sea el contenido de grasas, más tarda el estómago en vaciarse y más largo es el proceso de absorción.

Las mujeres absorben y metabolizan el alcohol de una manera diferente de los hombres. Tienen concentraciones de alcohol en la sangre más altas después de consumir la misma cantidad de alcohol que los hombres y son más susceptibles a las enfermedades del hígado y daños a los músculos del corazón y al cerebro relacionados con el alcohol. La diferencia entre las concentraciones de alcohol en

la sangre de las mujeres y de los hombres ha sido atribuida a la menor cantidad de agua del cuerpo femenino. Otro factor que contribuye a la diferencia de la concentración de alcohol en la sangre puede ser que las mujeres tienen una actividad más baja de la encima ADH en el estómago, lo cual hace que una proporción más elevada del alcohol ingerido alcance la sangre. La combinación de estos factores puede hacer a las mujeres más vulnerables que los hombres a los daños de hígado y corazón relacionados con el alcohol (Norton y col., 1987).

El etanol es volátil y, como resultado, una cantidad de alcohol, en proporción a la concentración de la sangre, pasa de la sangre a los sacos de aire alveolar en los pulmones. Por lo tanto, es posible analizar una muestra de aire alveolar para determinar la concentración alcohólica del aliento y predecir, con mucha precisión, la concentración en la sangre en ese mismo momento.

La oxidación del etanol lleva a la producción de distintos tipos de radicales libres, anión superóxido, radical hidroxilo y radical hidroxietilo. Estos radicales producen lesión oxidativa a distinto nivel intracelular. Reaccionan con los lípidos de membrana generando peroxidación de los mismos, hecho que se relaciona con lesión hepática aguda y fibrosis. El consumo crónico de alcohol depleciona además, los depósitos de antioxidantes naturales, vitamina A, E y glutatión. (Arteel G. E. 2003).

Si bien el acetaldehído se metaboliza rápidamente a acetato, en los alcohólicos su metabolismo es más lento por lo que tiende a la acumulación. De esta manera puede transformarse en sustrato de la enzima xantino-oxidasa y producir radicales libres, con las consecuencias ya mencionadas (Holstege A. y col., 1994).

El acetaldehído, producido por la oxidación del etanol a través de cualquiera de los sistemas enzimáticos descritos, es metabolizado en acetato por la aldehído deshidrogenasa hepática. La ALDH es una enzima tetramérico que oxida gran variedad de aldehídos alifáticos como el acetaldehído, además de otros aldehídos de tipo aromático. La ALDH mitocondrial oxida el acetaldehído mediante la

transferencia de hidrógeno al cofactor NAD y así forma ácido acético o acetato. El acetaldehído se metaboliza fundamentalmente en la mitocondria, al contrario que el etanol, cuyo metabolismo hepático es esencialmente citosólico.

La oxidación del etanol en humanos y otros animales se da en dos etapas y acontece principalmente en el hígado. A pesar de ello, existe la posibilidad de que, junto a la periferia, exista un metabolismo cerebral del etanol. Esta posibilidad queda sustentada por la demostración de la existencia, en el SNC, de diferentes sistemas enzimáticos capaces de metabolizar etanol.

En el caso del cerebro el mapa enzimático es menos conocido que en el hígado y parece ser un tanto diferente. De hecho la importancia relativa de los sistemas enzimáticos parece variar notablemente en el cerebro en relación al hígado. Así la ADH clase I, que en el hígado es el principal oxidante del etanol a concentraciones bajas y moderadas, posee una muy limitada actuación en el SNC (Raskin Sokoloff, 1972). Fundamentalmente, en el cerebro de humanos y también en el de roedores, la isoforma más abundante de esta enzima es la clase III (Rout U. K., 1992). Sin embargo esta isoforma, tiene baja afinidad por el etanol y difícilmente es activada por éste; ya que aún en severas intoxicaciones etílicas, no se alcanzan las concentraciones necesarias para que su contribución sea relevante (Gill K. y col., 1992).

También se ha descrito la presencia de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS, y en concreto se ha demostrado que el CYP450 cerebral es inducido por el etanol como ocurriría en el hígado (Lands W. E. 1998). Se sabe que la distribución cerebral del CYP2E1 en humanos no es uniforme (Upadhyya S. C. y col., 2000); concentrándose sobre todo en neuronas del cortex cerebral, células de purkinje y granulares del cerebelo, el giro dentado y el hipocampo. De esta forma, aunque solamente cantidades muy pequeñas de alcohol sean oxidadas en el cerebro, la generación local de acetaldehído puede tener importantes consecuencias funcionales. Por ejemplo, esta inducción ha sido

asociada con la aceleración de la lipidoperoxidación y posiblemente con los efectos tóxicos del etanol y la alteración de las membranas neuronales (C. Montoliu y col., 1994).

Finalmente existe un gran número de pruebas de que el sistema catalasa-peróxido de hidrógeno se haya presente y activo en el SNC (Zimatkin S. M. y col., 1998). Algunas investigaciones han presentado pruebas indirectas de la oxidación de etanol a acetaldehído en el cerebro de rata, vía este sistema enzimático. Estudios inmunohistoquímicos (Moreno S. y col., 1995) han puesto de relieve que la catalasa se sitúa fundamentalmente en los cuerpos de neuronas catecolaminérgicas del tronco encefálico y también en ciertos tipos de glía de las mencionadas áreas, por tanto el número total de células con alta concentración de catalasa es muy pequeña en relación al total del cerebro. Estos datos sugieren que aunque la cantidad total de acetaldehído que pueda producirse en el encéfalo a través de la catalasa sea pequeña, existe la posibilidad de que se produzcan acumulaciones de acetaldehído suficientes para provocar cambios en la fisiología y la actividad de determinados grupos neuronales.

Los tejidos de otros órganos corporales tales como el riñón, el corazón o el estómago también presentan uno o más de los sistemas enzimáticos a los que nos hemos referido, y por tanto, son capaces, de oxidar etanol a acetaldehído. A este respecto, el metabolismo más estudiado ha sido el digestivo. En el estómago humano se han descrito tres clases de ADH: ADH clase I, ADH clase III y ADH clase IV, que parece casi exclusiva para este tejido y que no se encuentra en el hígado (Lieber C. S. 1997). La mayoría de la oxidación gástrica del etanol tiene lugar en la mucosa mediante la ADH clase I y IV.

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 (2004) se refiere 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 y col., 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 endógeno.

A nivel de los receptores de dopamina, 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 B-endorfinas cerebrales, mismas 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. 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 alcohol es un depresor del SNC (la aparente alegría derivada de su consumo no es otra cosa que la depresión de los centros inhibitorios corticales, que permite la realización de actos no permitidos por el individuo en estado de sobriedad). Por otro lado, el alcohol ocasiona una vasodilatación que lleva a hipotermia, irritación de las mucosas, en especial del tracto gastrointestinal y laringe (que lleva a

alteración en la absorción de nutrientes, vitaminas y aminoácidos); malnutrición por la inadecuada ingesta de alimentos derivada del alto valor calórico (mas no nutricional) del alcohol, de casi 7.1 calorías por gramo; diuresis por inhibición de la hormona antidiurética; disminución de la libido por disminución de la testosterona y aumento de estrógenos con daño testicular; compromiso del sistema nervioso periférico (neuropatía periférica por disminución de la Tiamina y de la vaina de mielina) y del SNC (trastornos mnésicos, alucinaciones, celotipia, trastornos del sueño con disminución de la latencia, disminución del REM y despertar prematuro y vértigo por disfunción de la serotonina debido a la disminución del Triptófano, cambios degenerativos del cerebelo); gastritis, úlceras pépticas, cirrosis y pancreatitis (15% de los que tienen una ingesta masiva); cáncer de esófago, estómago y otras partes del tracto gastrointestinal, leve elevación de la presión arterial y elevado riesgo de enfermedad cardiaca; temblor, marcha inestable y disfunción eréctil.

Presenta tolerancia cruzada con los barbitúricos y BZD por acción sobre receptores GABA-A (Ticku M. K., 1989). El alcohol tiene interacciones con anticonvulsivantes, aspirina, anticoagulantes y drogas antidiabéticas incluida la insulina, por la competencia que ejerce sobre las vías enzimáticas.

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, 1988; Windle, 1995).

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. La tolerancia a los efectos del etanol puede ser producida por diferentes mecanismos.

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 (Ayesta F. J., 2002).

Síndrome de abstinencia: el síndrome de abstinencia alcohólico es un fenómeno complejo que ocurre a diversos niveles cerebrales. En líneas generales, se caracteriza por síntomas contrarios a los producidos por la exposición aguda al etanol unido a una activación simpática. Este síndrome refleja, en parte, las consecuencias de los cambios celulares responsables de la tolerancia alcohólica. No obstante, sólo algunos de los cambios característicos de la tolerancia se ven reflejados en la abstinencia; de la misma manera, hay fenómenos que sin afectar a la intensidad de los efectos (a la tolerancia) juegan un papel importante en la manifestación de la sintomatología abstinenta (Diamond y A. S. Gordon, 1997).

El aumento de la actividad simpática que se observa en el síndrome de abstinencia está en gran parte mediado por la hiperactividad del locus coeruleus, hiperactividad debida a la pérdida de auto-inhibición noradrenérgica causada por la hipofunción de los receptores presinápticos α_2 -adrenérgicos.

Manifestaciones de esta hiperactividad simpática son, entre otros síntomas, la taquicardia, la hipertensión, la sudoración y el temblor (Ayesta F. J., 2002). Los principales aspectos desencadenantes de la hiperactividad NMDA en la abstinencia alcohólica son: el aumento del flujo intracelular de calcio que conlleva a pérdida de memoria y muerte neuronal, así como convulsiones del delirium tremens. Otro aspecto es la pérdida de magnesio, que al ser un ión antagonista natural del glutamato, su ausencia predispondría a las acciones excitadoras del glutamato.

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 A. S. Gordon, 1997). Entre los puntos en los que el etanol actúa se encuentran canales iónicos, transportadores, receptores, proteínas G y proteín-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 M. J. y cols, 1998; Stubbs C. D. y Slater S. J., 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 A. S. Gordon, 1997).

La mayor parte de las acciones del etanol se deben 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 inhibitorio 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 D., 1999).

Entre los diversos sistemas de neurotransmisión que han sido implicados en las acciones agudas del etanol, destacan el sistema opioide y el sistema serotoninérgico. Las evidencias arrojadas por algunas investigaciones indican que gran parte de los canales iónicos pueden ser modulados por el etanol. A nivel 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 liberación de dopamina a nivel de los núcleos de los circuitos de recompensa (Área Tegmental Ventral y Núcleo Accumbens), responsable en gran manera de sus propiedades adictivas, no es una acción directa del etanol.

a) Mecanismos moleculares.

1. Relacionados con el receptor GABA_A: la exposición crónica al etanol produce incremento (up-regulation) en el número de subunidades $\alpha 6$. Esto podría influir en la tolerancia, ya que la subunidad $\alpha 6$ es el sitio en el que actúan agonistas inversos de las benzodiazepinas (como el flumacénilo), por lo que se produciría una hipofunción GABA_A. En estudios con personas alcohólicas se ha observado una reducción en el número de sitios de fijación GABA_A de la corteza frontal y en otras áreas, así como que el lorazepam produce menores respuestas funcionales. Sin embargo aún no se ha descartado que estos cambios puedan ser señal de una predisposición y no una consecuencia del consumo etílico (Diamond y A. S. Gordon, 1997; Nutt D., 1999).

2. Relacionados con el receptor NMDA: la exposición crónica del etanol también da lugar a un aumento en el número de receptores NMDA, aumento que es responsable de una disminución en los efectos del etanol. Este incremento en el número de receptores NMDA sirve para contrarrestar el efecto del etanol cuando está presente; no obstante, en ausencia de etanol, este mayor número de receptores NMDA da lugar a una hiperfunción glutamatérgica, que explica la hiperexcitabilidad que se ve en la abstinencia alcohólica.

3. Relacionados con canales dependientes de voltaje: el incremento de canales de calcio dependientes de voltaje inducido por etanol es responsable de muchos de los signos y síntomas que aparecen en el síndrome de abstinencia, como son la intensa hiperactividad neuronal y las convulsiones potencialmente letales. La exposición crónica al etanol da lugar a un incremento en el número de canales de calcio, sobre todo tipo L, que se traduce en un mayor flujo intracelular de calcio dependiente de voltaje, efecto que parece estar mediado por proteínas cinasas C (Ayesta F. J., 2002).

b) Mecanismos celulares.

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-quinasa 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 (Diamond y A. S. Gordon, 1997).

c) Circuitos cerebrales de recompensa.

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 numerosas 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 Área Tegmental Ventral (ATV), el Núcleo Accumbens (NA) y el cortex prefrontal. En esta acción placentera juega un papel importante 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 median la producción de la sensación de bienestar.

Las conductas de autoadministración – y las de autoestimulación eléctrica – dependen críticamente de la integridad funcional de la transmisión dopaminérgica de los sistemas mesotelencefálicos, especialmente del sistema dopaminérgico mesolímbico. El haz prosencefálico medial que va desde el ATV a la corteza prefrontal, pasando por el núcleo accumbens, es la estructura más relevante dentro de este sistema dopaminérgico.

El núcleo accumbens se considera una interfase neural entre motivación y acción motora. Presenta dos territorios definidos: el núcleo y la corteza, cuyas conexiones dibujan sus vertientes motora y límbica nítidamente. La corteza actúa como detector de coincidencia, de señales potencialmente relevantes, capaz de activarse en situaciones conductuales con valor adaptativo, gracias a las conexiones que establece con la corteza frontal, hipocampo y amígdala. Esta activación de la corteza refuerza secuencias motoras intencionales en el núcleo y

en la corteza prefrontal, áreas que a su vez están conectadas con los sistemas motores extrapiramidal y piramidal (Ikemoto S. y Panksepp J., 1999). El núcleo accumbens libera dopamina ante la presencia de estímulos relevantes, ya sea por ser nuevos o por ser incentivadores. Estos estímulos no tienen porqué ser placenteros o estrictamente reforzantes, ya que también se libera dopamina ante estímulos aversivos. La misión fundamental del accumbens parece estar en la incentivación de los estímulos no condicionados, pero no en su recuerdo o recuperación, ni tampoco en la percepción cognitiva de los estímulos ambientales. En la experiencia subjetiva del craving, así como en las recaídas ocasionadas por el consumo o por los estímulos asociados al consumo, también se observa la activación de los sustratos relacionados con este sistema de recompensa dopaminérgico.

Los circuitos de recompensa no son exclusivamente dopaminérgicos e incluyen componentes a tres niveles. Conceptualmente el más importante es el mencionado, compuesto por neuronas dopaminérgicas telencefálicas cuyas fibras terminan en el núcleo accumbens. Constituye lo que se denomina el segundo nivel de fibras de los sistemas de recompensa. La activación de estas fibras puede ser directa, o indirecta, bien a través de neuronas cercanas posiblemente opioides o bien a través de diversas vías no dopaminérgicas heterogéneas que convergen ahí anatómicamente, siendo responsables del establecimiento y modulación del tono hedónico; forman el primer nivel de recompensa. Este primer nivel de recompensa está constituido por neuronas mielinizadas descendentes cuyas fibras van por la parte caudal del haz prosencefálico medial. Estas fibras provenientes de diferentes estructuras (como el hipotálamo anterior lateral, la rama horizontal de la banda diagonal de Broca, el núcleo intersticial de la estría medular, el área lateral preóptica, el núcleo magnocelular preóptico, el tubérculo olfatorio, la sustancia innominada y el pálido ventral) y, como se ha señalado, suelen ser no dopaminérgicas. Tienen sus sinapsis en los núcleos ventrales mesoencefálicos que contienen los cuerpos celulares del sistema dopaminérgico mesotelencefálico ascendente. Son especialmente relevantes en la autoestimulación eléctrica. Así mismo, existe un tercer nivel, cuyas neuronas llevarían las señales integradas de

recompensa más allá del núcleo accumbens hacia —o a través de— el pálido ventral, mediante fibras encefalinérgicas y/o gabérgicas (Altman y col., 1996). El crucial componente dopaminérgico del sistema de recompensa es modulado así mismo 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.

d) Neurotransmisores implicados en las acciones reforzadoras del etanol.

La ubicua distribución cerebral de aminoácidos inhibidores y excitadores, y la actuación del etanol en algunos de sus receptores, sugiere que la acción reforzadora del etanol podría estar mediada al menos en parte, por estos aminoácidos. Los receptores GABA_A juegan un papel crucial en el reforzamiento del etanol, ya que sus agonistas aumentan la autoadministración del etanol en ratas, ejerciendo el efecto contrario sus antagonistas.

La estimulación de receptores NMDA ejerce una influencia inhibitoria en el reforzamiento; por el contrario sustancias bloqueantes de estos receptores son autoadministradas por primates (Faingold C. L. y col., 1998).

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 las interneuronas de neuronas gabaérgicas que hacen sinopsis con 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 (Di Chiara G. y col., 1996).

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. 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.

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 (J. S. Mazana, 2001). Ambos, péptidos y receptores se hallan profusamente distribuidos en el SNC, lo que evidentemente indica un importante papel fisiológico del 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, y 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 (J. S. 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 diencéfalo 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 (J. L. Santos M. y col., 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 transmembrana 7 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

Interesantemente 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 (J. M. Van Ree y cols., 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 coneurotransmisión (Acuña M., 1998).

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 C., 1993; Hunt W. A., 1993; Ulm R. R. y col., 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 alcohol 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 A., Di Chiarra G., 1986; Wise R. A., 1980; Wise R. A., Bozarth M. A., 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 G. D., Breese G. R., 1981; Wise R. A., Bozarth M. A., 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 y Bozarth (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 R. R., y col., 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 C., 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 L. D., Hunter G. A., 1884; Wild K. D., Reid L. D., 1990), mientras que dosis moderadas-altas las reducen (Volpicelli J. R., col., 1991). Por otra parte, en condiciones de privación de opiáceos, los animales parecen compensarla aumentando la ingesta de alcohol (Ho A. K., Chen R. C., 1976). De la misma manera individuos dependientes de opioides incluidos en terapias de sustitución (metadona), generalmente ingieren más alcohol (El-Bassel N., y col., 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 J. C., 1995; Froehlich J. C., y col., 1990; Myers R. D., Borg S., Mossberg R., 1986; Reid L. D., Hunter G. A., 1984; Ulm R. R., y col., 1995) y reducen tanto el número de episodios de recaídas como el tiempo de latencia entre ellos, en pacientes alcohólicos abstinentes (O'Malley S. S., y col., 1992; Volpicelli J. R., y col., 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 M. A., Wise R. A., 1984; Shippenberg T. S., y col., 1992; Van Wolfswinkel L., Van Ree J. M., 1985).

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

6. Evidencias recientes sugieren una posible predisposición genética relacionada con el consumo de alcohol, tanto en roedores como en el hombre (De Waele J. P., y col., 1992; Gianoulakis C., y col., 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 (P), es superior al detectado en las cepas correspondientes que no prefieren alcohol (NP) (De Waele J. P., y col., 1992; Gianoulakis C., y col., 1992). De la misma manera, los niveles de péptidos derivados de POMC también son distintos en ambas líneas de ratas (Gianoulakis C., y col., 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 J. C., 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 adrenocorticotropa (ACTH), β -endorfina y glucocorticoides (Lukas S. E., Mendelson J. H., 1988; Noth R. H., Walter R. M. Jr., 1984). Se ha propuesto que la liberación de estas hormonas podría estar relacionada con algunos de los efectos eufóricos y ansiolíticos del alcohol (Lukas S. E., Mendelson J. H., 1988; Pohorecky L. A., 1991). Diversos estudios en animales han mostrado que la exposición a alcohol modifica el contenido y la liberación de β -endorfinas. La administración aguda intragástrica (Patel V. A., Pohorecky L. A., 1989) o intraperitoneal (Ho Aks, Allen J. P., 1981) de alcohol, así como el tratamiento crónico con la sustancia (Seizinger B. R., y col., 1984) aumentan respectivamente, los niveles plasmáticos (Ho Aks, Allen J. P., 1981; Patel V. A., Pohorecky L. A., 1989) hipotalámicos (Patel V. A., Pohorecky L. A., 1989), y el contenido y la liberación in vitro de endorfina en la adenohipófisis (Seizinger B. R., y col., 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 C. y col., 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 G., y col., 1996). La liberación de dopamina del núcleo accumbens inducida por alcohol es bloqueada por antagonistas no específicos de receptores opiáceos, como la naltrexona (Benjamin D., y col., 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 al 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 B., Hoffman P. L., 1983). Sin embargo, la exposición a alcohol a largo plazo reduce la actividad de receptores μ en ratones (Hoffman P. L., y col., 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 J. C., y col., 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 K-J, Cuatrecasas P., 1981; Chang K-J., y col., 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 K., y col., 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.

SISTEMA ENDOCRINO

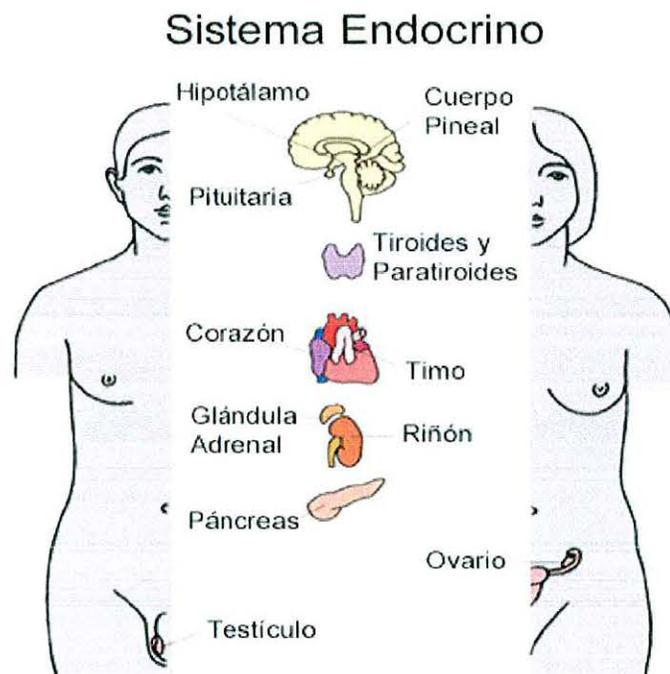
El sistema endocrino, en conjunto con el sistema nervioso representa el principal medio a través del cual en nuestro cuerpo, se transmite información entre células y tejidos diferentes; pudiéndoseles adjudicar un papel regulador sobre diversas funciones corporales. El sistema endocrino u hormonal es 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: o glándula pituitaria, es una glándula compleja que se aloja en una cavidad ósea llamada "silla turca" del hueso esfenoides, situada en la base del cráneo, en la fosa cerebral media, que conecta con el hipotálamo a través del tallo hipofisiario y que consta de dos partes: Lóbulo anterior o adenohipófisis y lóbulo

posterior o neurohipófisis, ambos segregan hormonas diferentes. El lóbulo anterior segrega hormona del crecimiento, hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona estimulante de la corteza suprarrenal (ACTH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH) y prolactina; así mismo la hipófisis anterior produce sustancias llamadas endorfinas, que son péptidos que actúan sobre el sistema nervioso central y periférico. El lóbulo posterior segrega oxitocina y hormona antidiurética (ADH).

HIPOTÁLAMO: es una glándula que forma parte del diencefalo, y se sitúa por debajo del tálamo, y suele considerársele como el centro integrador del sistema vegetativo, dentro del sistema nervioso central. Controla muchas funciones corporales incluyendo la ingesta de alimentos y líquidos, funciones y conductas sexuales, presión sanguínea y palpitations cardiacas, mantiene la temperatura corporal, el ciclo vigilia-sueño y estados emocionales. Es una porción del cerebro de donde deriva la hipófisis, secreta hormonas que circulan y se almacena en el lóbulo posterior de la hipófisis. La secreción de tres de las hormonas de la hipófisis está sujeta a control hipotalámico: la secreción de la tiotropina está estimulada por el factor liberador de tiotropina (TRF), y de hormona luteinizante, por la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH). La dopamina elaborada por el hipotálamo suele inhibir la liberación de prolactina por la hipófisis anterior. Además la liberación de la hormona del crecimiento se inhibe por la somatostatina, sintetizada también en el páncreas.

Una de las funciones del sistema endocrino es mantener en equilibrio al organismo, por medio de diversas glándulas relacionadas con los factores liberadores del hipotálamo, los cuales regulan la síntesis y secreción de las hormonas producidas en la hipófisis. A su vez, las hormonas hipofisarias regulan la actividad de distintas glándulas endocrinas que les sirven de blanco. Característicamente los niveles elevados de hormonas dan por resultado la inhibición por retroalimentación, tanto directa como indirecta, de su producción por la glándula que las origina.

TIROIDES: glándula endocrina situada en la parte frontal del cuello a la altura de las vértebras C5 y T1, justo debajo de la manzana de Adán junto al cartílago tiroides sobre la traquea y cubierta de varias capas de piel y músculo. Es una glándula endocrina bastante grande formada por dos lóbulos en forma de mariposa a ambos lados de la traquea. Su principal función es la producción de las hormonas tiroxina y triyodotironina, las cuales aumentan el consumo de oxígeno y estimulan la tasa de actividad metabólica, regulan el crecimiento y la maduración de los tejidos del organismo y actúan sobre el estado de alerta físico y mental. El tiroides también secreta una hormona denominada calcitonina, que disminuye los niveles de calcio en la sangre e inhibe su reabsorción ósea.

GLÁNDULAS PARATIROIDES: se localizan en un área cercana o están inmersas en la glándula tiroides, la hormona paratiroidea regula los niveles sanguíneos de calcio y fósforo y estimula la reabsorción del hueso.

OVARIO: es la gónada femenina productora de hormonas sexuales y óvulos. Son estructuras pares de color blanco rosado, situadas a ambos lados del útero. Los folículos ováricos producen óvulos que segregan estrógenos y progesterona, hormonas que, inducen y mantienen los cambios físicos de la pubertad y las características sexuales secundarias, apoyan la maduración del endometrio uterino a la espera de una posible implantación de un óvulo fecundado y suministran señales adecuadas al hipotálamo y la pituitaria para mantener el ciclo menstrual. Así mismo los estrógenos también producen una hormona llamada relaxina, que actúa sobre los ligamentos de la pelvis y el cuello del útero y provoca su relajación durante el parto, facilitando de esta forma el alumbramiento. La actividad del ovario está regulada por las concentraciones en sangre de las hormonas hipofisarias FSH y LH, la secreción de ambas hormonas depende del factor liberador de gonadotropinas hipotalámico.

TESTÍCULO: las gónadas masculinas o testículos son cuerpos ovoideos pares que se encuentran suspendidos en el escroto. Las células de leydig de los testículos producen una o más hormonas masculinas, denominadas andrógenos. La más importante es la testosterona, que estimula el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, influye sobre el crecimiento de la próstata y vesículas seminales, y estimula la actividad secretora de estas estructuras, los testículos también contienen células que producen el esperma.

PANCREAS: es un órgano retroperitoneal situado detrás de la parte inferior del estómago, secreta insulina, glucagón y somatostatina para regular la cantidad de glucosa en sangre. La mayor parte del páncreas está formado por tejido exocrino que libera enzimas en el duodeno. Por todo el tejido que conforma a éste órgano hay grupos de células denominados islotes de Langerhans, cada una de estas células en estos sitios tiene un fin determinado: las células alfa producen glucagón, que eleva el nivel de glucosa en la sangre; las células beta producen insulina; y las células delta producen somatostatina.

GLANDULAS SUPRARRENALES: o adrenales, en los mamíferos son glándula endocrinas, que están situadas encima de los riñones, cuya función es la de regular las respuestas al estrés, a través de la síntesis de corticosteroides y catecolaminas, que son el cortisol y la adrenalina principalmente. Estas glándulas están formadas por estructuras diferentes que son la médula suprarrenal y la corteza suprarrenal, ambas inervadas por el sistema nervioso autónomo. Como su nombre sugiere, la medula suprarrenal está situada dentro de la glándula, rodeada por la corteza suprarrenal que forma la superficie. La medula suprarrenal produce adrenalina y noradrenalina que afectan a un gran número de funciones del organismo, ya que estimulan la actividad del corazón, aumentan la tensión arterial y actúan sobre la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos y la musculatura. La corteza suprarrenal elabora un grupo de hormonas denominadas glucocorticoides, que incluyen la corticosterona y el cortisol, y los mineralocorticoides, que incluyen la aldosterona y otras sustancias hormonales

esenciales para el mantenimiento de la vida y la adaptación al estrés. Las secreciones suprarrenales regulan el equilibrio de agua y sal del organismo, influyen sobre la tensión arterial, actúan sobre el tejido linfático, influyen sobre los mecanismos del sistema inmunológico y regulan el metabolismo de los glúcidos de las proteínas. Además, las glándulas suprarrenales también producen pequeñas cantidades de hormonas masculinas y femeninas.

Por todo lo anterior podemos decir que las hormonas son los productos químicos de la acción del sistema endocrino, y constituyen mensajeros químicos que son producidos por una célula para afectar el metabolismo de otra. Las principales características de las hormonas son que se producen en pequeñas cantidades y se liberan al espacio extracelular, viajando a través de la sangre logran afectar tejidos que se encuentran lejos de su punto de origen y además que su efecto es directamente proporcional a su concentración.

DEFINICIÓN DE 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. Actualmente se ha hecho evidente el papel de las hormonas como neurotransmisores y como moduladores de algunos otros neurotransmisores.

CLASIFICACIÓN DE LAS HORMONAS

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. La secuencia de aminoácidos constituida por enlaces covalentes, determina entonces la estructura primaria de un péptido; las proteínas son macromoléculas formadas por una o varias cadenas de polipéptidos. Las hormonas polipeptídicas 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; su tasa depende de la regulación de las enzimas limitantes que, intervienen en la biosíntesis a partir de la hidroxilación y segmentación de las cadenas laterales del colesterol, para producir pregnenolona.

La rapidez de secreción de los esteroides presenta una relación estrecha con su tasa de síntesis, ya que, una gran cantidad de hormona no puede ser almacenada por la célula, y sale rápidamente de ella a través de la membrana. La secreción de esteroides, depende principalmente de mecanismos de retroalimentación tanto a nivel central como hipofisiario (Juárez, 2001).

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.

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. Un mecanismo de control fisiológico común es la servo-regulación. La retroalimentación ("feed-back) más común en fisiología endocrina es la negativa en los diferentes ejes, los circuitos pueden ser largos, cortos o ultracortos. 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 Irma, 1996). Cualquier molécula que se vierta en la sangre y pueda ser reconocida por un receptor, en o sobre un tejido celular para llevar información, puede ser usada por el organismo como una hormona. Las hormonas pueden ser divididas por su liberación en dos grandes clases: las que son guardadas en vesículas y son liberadas desde una célula endocrina por fusión de las vesículas con la membrana plasmática, como respuesta a un estímulo; y

aquellas que son secretadas inmediatamente sobre la síntesis de una forma no mediada por la fusión de la vesícula a la membrana, existen mecanismos de transporte específicos que se encuentran fuera de la célula y que hacen posible el paso de los esteroides del espacio intracelular al extracelular.

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.

EFFECTOS DE LAS HORMONAS

Cada hormona puede tener funciones diferentes, aunque a menudo algunas son tal vez más importantes que otras. La acción puede ser directa (en los tejidos) o a través de la liberación de otras. Se desconoce la forma en que las hormonas ejercen muchos de sus efectos metabólicos y morfológicos. Sin embargo se piensa que los efectos sobre la función de las células se deben a su acción sobre las membranas celulares o enzimas, mediante la expresión de los genes o mediante el control de la liberación de iones u otras moléculas pequeñas.

Juárez J. (2001) ha descrito que la acción de una hormona sobre su órgano blanco está regulada por varios factores:

- Tasa de síntesis y secreción de la hormona
- La disponibilidad de los sistemas específicos de transporte en plasma, los cuales ayudan a preservar la vida media de la hormona circulante
- La cantidad de receptores específicos en la membrana plasmática o en el citosol
- La posible conversión de la hormona a metabolitos más activos en las células diana
- El sinergismo biológico entre diferentes hormonas cuando actúan simultáneamente o en forma secuencial, lo cual puede modificar la susceptibilidad de la célula a la acción hormonal
- La tasa de degradación de la hormona

Cualquier variación en alguno de estos factores puede cambiar la actividad o la cantidad de una hormona en un tejido dado.

Los principales efectos de las hormonas son: estimulante al promover la actividad en un tejido; inhibitorio: ya que disminuye la actividad en el tejido; y antagonista: cuando un par de hormonas tiene efectos opuestos entre sí.

La forma como las hormonas actúan en las células blanco es por medio de activaciones enzimáticas o por modulación de la expresión genética, estimulando la transcripción de un grupo específico de genes. Esta actividad la logran por medio de la interacción, bien con receptores de membrana, o bien, con receptores nucleares.

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 tiene 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. Por su parte la información necesaria para que la célula sintetice una proteína específica y no otra, se halla contenida en el núcleo celular, en los cromosomas, los cuales contienen la información de miles de proteínas susceptibles de ser fabricadas por la célula en respuesta a un estímulo adecuado. Para que el receptor realice su misión de síntesis de nuevas proteínas, se debe unir a zonas del ADN, llamadas secuencias, que reconoce de manera específica. A estas secuencias se les conoce genéricamente como "elementos de respuesta", y son clave para activar el inicio de la transcripción de la información contenida en el ADN para dar lugar al ARNm. A partir de la unión del complejo hormona-receptor a su elemento de respuesta se activa todo el mecanismo de copia.

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 esteroideas tiroideas. El complejo hormona-receptor se forma debido a la afinidad existente entre el receptor y la hormona correspondiente.

Receptores de membrana celular: tienen regiones que contribuyen a tres dominios básicos, como son los extracelulares, los transmembrana, y los intracelulares. Los receptores de membrana son de varias clases, siendo los más comunes los siete transmembrana acoplados a proteínas G (llamados 7TM o GPRC), proteínas que al ser activadas producen los segundos mensajeros, que actúan como señales intracelulares cuando la hormona no puede atravesar la membrana, como en el caso de las proteicas. Estos segundos mensajeros son: EL adenosin monofosfato cíclico (AMPc); el 1, 4, 5-inositol trifosfato (IP3); el diacilglicerol (DAG) y el calcio; el guanosin monofosfato cíclico (CMPC). Una hormona puede utilizar diferentes segundos mensajeros y estos a su vez pueden ser producto de la interacción de los receptores con diferentes hormonas.

Receptores intracelulares: localizados en el citosol, son los utilizados por las hormonas esteroideas que alcanzan el citoplasma celular mediante difusión pasiva, tras su unión se trasladan al núcleo-translocación, uniéndose a secuencias específicas reguladoras de DNA, controlando así la tasa de transcripción de RNA a partir de los genes controlados por estos elementos reguladores, y así la síntesis de RNAm aumenta o disminuye y la síntesis de proteínas citoplasmáticas que median los efectos de la hormona se incrementa o se reduce.

ESTEROIDES

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. Estos receptores son factores nucleares de transcripción que regulan la expresión de diferentes genes. 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. Además el cerebro sintetiza diversos esteroides directamente a partir del colesterol y con independencia de los niveles

sistémicos de hormonas gonadales. Estos esteroides endógenos, conocidos como neuroesteroides, afectan la función cerebral actuando sobre los receptores para aminoácidos neurotransmisores.

García Segura (1999), afirma que el núcleo arcuato hipotalámico es un centro clave para la regulación neuroendocrina, y se lo ve como un modelo de plasticidad sináptica asociada a la liberación de gonadotropinas. En éste núcleo es posible ver que durante las fases preovulatoria y ovulatoria del ciclo estral se produce una desconexión transitoria de sinapsis GABAérgicas sobre los somas de las neuronas del arcuato en ratas hembras adultas.

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. Se encuentran en todos los organismos, y están asociados con diversas funciones. 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.

De la corteza suprarrenal derivan tres clases de esteroides:

1. los glucocorticoides, que primordialmente afectan el metabolismo de las proteínas, carbohidratos y lípidos, se sintetizan en la zona fascicular.
2. los mineralocorticoides, que influyen sobre el transporte de electrolitos y la distribución del agua en los tejidos, se sintetizan en la zona glomerular.
3. los andrógenos y estrógenos, que afectan las características sexuales secundarias en los órganos específicos que les sirven de blanco, se sintetizan en la zona fascicular y reticular.

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 esteroideas, 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.

Tanto algunos de los esteroides secretados por las glándulas suprarrenales como los secretados por las gónadas se llaman esteroides sexuales. Los esteroides producidos por las gónadas poseen la capacidad de estimular y mantener los caracteres sexuales secundarios y se clasifican en andrógenos, estrógenos y progestágenos. Las hormonas esteroideas atraviesan libremente la barrera hematoencefálica, por lo que alcanzan todas las células del tejido nervioso (Luquín, 1995).

La cantidad de evidencias científicas va en aumento en cuanto a que se ha demostrado que las diferencias en el comportamiento y las habilidades cognitivas (y por ende el funcionamiento cerebral) dependen de los niveles de hormonas sexuales, dichas hormonas pueden tener un efecto organizador sobre el desarrollo anatómico y funcional del sistema nervioso y otro activador sobre los sistemas fisiológicos ya formados.

Las hormonas sexuales se unen al receptor ya sea en el citosol o en el núcleo celular, reaccionando con la cromatina e influye en la formación de moléculas de RNAm, aumentando su síntesis al igual que el RNAt. Se ha observado que se necesita de la síntesis de RNA y de proteína para que los efectos hormonales de los esteroides se hagan evidentes.

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 folículo-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).

Las gónadas son la fuente principal de esteroides sexuales, los cuales ejercen una intensa actividad anabólica proteica, y cuya secreción está regulada por las hormonas trópicas de la hipófisis, las cuales actúan en parte, haciendo que disminuya el AMPc intracelular (Del Río Irma, 1996). El estradiol y la progesterona son producto de las glándulas ováricas y representan los esteroides más importantes para el despliegue de la conducta sexual femenina, también llamada estral en animales mamíferos (Kubli, 1993). En gran medida estas hormonas son responsables de la regulación del ciclo estral o menstrual. La progesterona se produce solo durante un determinado periodo del ciclo, fundamentalmente después de la liberación del óvulo desde los folículos rotos, en ese momento comienza a regular la preparación de la mucosa uterina para el depósito del óvulo fecundado. Si el óvulo no es fecundado, el nivel de progesterona decae y su producción no se renueva hasta el ciclo siguiente.

La síntesis de estrógenos y progesterona se lleva a cabo en los ovarios a partir, principalmente del colesterol que hay en la sangre, pero también aunque en menor extensión, a partir de la acetilcoenzima A, de la que pueden combinarse moléculas múltiples para formar el núcleo esteroide apropiado. Estas hormonas se transportan en la sangre, acarreadas principalmente por la albúmina plasmática, aunque se fijan también en pequeñas cantidades en globulinas específicas de cada una de estas dos hormonas.

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 a nivel periférico como a nivel 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. Tienen un efecto activador en el SNC que lleva a una elevación en el estado de ánimo, un mayor nivel de actividad con efectos antidepresivos.

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.

Además afectan el desarrollo de la corteza cerebral, el tamaño de las neuronas, las conexiones interneuronales y el volumen del núcleo de las neuronas, modulan la liberación de neuropéptidos, neurotransmisores y neurohormonas, y tienen

efectos antioxidantes ya que aumentan la utilización de la glucosa por el cerebro. 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. Los estrógenos que se secretan principalmente en los ovarios son el 17β -estradiol, es considerado el principal estrógeno circulante, y la estrona (en cantidades pequeñas), la formación de ésta última tiene lugar principalmente en los tejidos periféricos a partir de los andrógenos que secretan las cortezas suprarrenales y las células de la teca y del estroma del ovario. El estriol es un producto oxidativo derivado del estradiol y de la estrona. Su conversión ocurre principalmente en el hígado.

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, 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). Así mismo Kerdelhué y col., (1988), han observado que durante el periodo preovulatorio, tanto en ratas como en mujeres, se pueden cuantificar concentraciones plasmáticas reducidas de β -endorfinas. Una de las acciones más importantes de los estrógenos es que son capaces de inducir la producción de proteínas y enzimas relacionadas con la síntesis y recambio de receptores a neurotransmisores.

Es evidente la importancia del estradiol en los ciclos menstruales de los primates y estarles 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.

RECEPTORES ESTROGÉNICOS

Los efectos fisiológicos del estradiol (hormona esteroide producida en los ovarios, y la más poderosa de las hormonas femeninas denominadas estrógenos), son distribuidos a través del cuerpo por proteínas receptoras de estrógenos localizadas en las células.

El estradiol, fluye a través del sistema circulatorio y es por consiguiente capaz de alcanzar a cada una de las células del cuerpo. 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 17β -estradiol, además de ejercer sus características acciones hormonales relacionadas con el desarrollo y la vida sexual de la mujer, ejerce efectos diversos celulares en el sistema nervioso central, tanto de la mujer como del varón y todas estas acciones son realizadas mediante su interacción con los receptores estrogénicos (RE), que se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central.

El 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 cuyo gen se encuentra en el cromosoma 14 (Brinton R. D., 2001). A los RE se les han dado también nombre de acuerdo a su localización celular, los hay de localización intranuclear; de localización intracitoplásmica, no nuclear; y aquellos de localización en la membrana celular.

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 inserta, 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 . Esta diferencia tan sustancial en la localización cerebral de los dos tipos de RE indica que median funciones diferentes (Shotaro Susuki y R. Handa, 2004).

TRANSPORTE DE LOS ESTRÓGENOS EN EL ORGANISMO.

Cuando se liberan hacia la circulación, los esteroides gonadales se fijan a proteínas plasmáticas. El estradiol se fija con avidez a la globulina de transporte llamada, globulina fijadora de hormona sexual (SHBG), y se fija con menor afinidad a la albúmina. La SHBG se sintetiza en el hígado, y dado que su síntesis

se estimula por estrógenos y se inhibe por andrógenos, los valores son el doble de altos en mujeres que en hombres.

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.

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.

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 (Susanne Hiller-Stumhöfel y col. ,1998), sintetizada como parte de una gran molécula de 92 aminoácidos, llamada prepro-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 (Teppa Garrán y col., 2004).

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 y col., (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 frenan 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.

Matthew J. Smith y Lotear Jennes, (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.

El ciclo estral o menstrual, resulta de una intrincada integración de eventos neuroquímicos y endocrinos actuando a nivel del SNC, pituitaria anterior y ovario (Freeman, 1994). Los diferentes modelos de secreción pulsátil de GnRH dentro del sistema porta hipofisiario, unido a cambios en la responsividad de gonadotropos de la pituitaria hacia la GnRH, provoca cambios en la secreción de LH y FSH observados a lo largo del ciclo estral. Las gonadotropinas estimulan en el ovario el crecimiento folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, con la consiguiente producción de esteroides sexuales. Estos productos ováricos pueden mediante mecanismos de retroalimentación, influenciar el ritmo de los pulsos de GnRH, afectar la sensibilidad del gonadotropo a la GnRH, así como la síntesis y secreción de FSH y LH por parte de las células hipofisiarias. Durante varios periodos del ciclo estral, los esteroides ováricos, detienen la secreción de LH y FSH mediada por la GnRH a través de retroalimentación negativa. Evidencia reciente sugiere que el estradiol podría actuar directamente sobre algunas neuronas GnRH a través de mecanismos genómicos clásicos. Diversos estudios

han publicado que son necesarios los sistemas receptivos de aferentes de estradiol para la conducción apropiada de la ciclicidad reproductiva.

Muchos neurotransmisores clásicos y neuropéptidos alteran la actividad neuronal GnRH, a través de acciones directas y algunas veces indirectamente. Entre estos neurotransmisores podemos mencionar a las catecolaminas, GABA, glutamato, neuropéptido Y, neurotensina, β -endorfinas y péptido intestinal vasoactivo. Evidencia reciente neuroanatómica y molecular, propone que el estradiol influye en la actividad de todos estos sistemas de neurotransmisores y neuropéptidos, dentro de la red que conduce la ciclicidad reproductiva. La confirmación de una extensa coexistencia de diversos neurotransmisores, RNAm de receptores de neuropéptidos y proteínas en neuronas GnRH, vuelven a éstas neuronas altamente susceptibles de sufrir alteraciones que rompen con su función, la cual es, particularmente hablando del ciclo estral mantener la ciclicidad reproductiva.

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 rol de las β -endorfinas actuando a través de receptores opioides μ en la transmisión de la información a cerca del entorno esteroidal hacia neuronas GnRH. Las terminales nerviosas que contienen β -endorfinas, hacen sinapsis sobre el soma y dendritas 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 et al, 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.

Por tanto, 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.

INHIBIDORES DE AROMATASA

La enzima aromatasa es un complejo enzimático microsomal, el cual esta compuesto de dos proteínas: una reductasa ubicua NADPH-citocromo P450 y una aromatasa citocromo P450. Cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos y se localiza sobre el retículo endoplásmico. En humanos está expresada en el ovario, testículos, cerebro, tejido adiposo y en la placenta, esta última es particularmente una rica fuente en dicha 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, y cols., 2002). Dado que el paso final en la biosíntesis de los estrógenos es mediado por la enzima aromatasa, estos compuestos ofrecen la mejor oportunidad de inhibir potente y selectivamente la biosíntesis de estrógenos (Lawrence Woo, 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 in 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 (TMX) (antagonista estrogénico) en mujeres con metástasis (Ligebel J. A. y Winer E.P. 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 TMX, 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, 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.

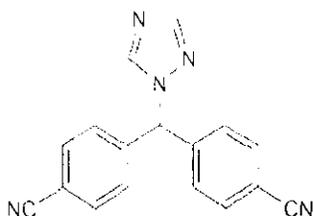
Letrozol es un polvo cristalino blanco a amarillento, prácticamente inodoro, soluble en diclorometano, moderadamente soluble en etanol, y prácticamente insoluble en agua.

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.



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 H. M., 1998).

Bhatnagar, (1995), sostiene 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.

M. Dowsett, explica que los inhibidores de aromatasa son generalmente descritos como inhibidores de tipo 1 o tipo 2. El tipo 1 son compuestos esteroides que podrían ser puramente inhibidores competitivos o sustratos suicidas irreversibles; y los inhibidores del tipo 2 son no esteroides y no presentan actividad hormonal. Cuando se usan aquellos esteroides del tipo 2 como tratamiento, particularmente LTZ en dosis de 2.5 mg/día, es posible observar que las pacientes muestran actividad aromatasa no detectable, ya que este fármaco provee de un 99% de supresión (I. E. Smith, 1999).

Odum, y col., (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 (Brand y col., 1990). Encontraron que la inhibición in vitro de la actividad aromatasa fue significativamente reducida por los tres inhibidores empleados.

R. Eshet y col., (2004), sostiene que la administración s.c. de 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 y col., (2004) reportaron que en ratas tratadas con LTZ (administrado en una solución acuosa de carboxmetilcelulosa 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.

Nuñez y col., (2004) compararon los efectos de TMX 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 TMX (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 TMX, 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 estudios previos en cuanto a que comparado con TMX, LTZ requiere una dosis mucho menor para ejercer un mejor efecto en la inhibición del crecimiento tumoral.

Brian J. Long y col., (2004) para probar la eficacia del LTZ, así como su uso óptimo en el tratamiento de cáncer de mama, en comparación con TMX, o combinados, utilizaron ratones ovariectomizados, los cuales recibieron inoculaciones subcutáneas en 4 sitios con la solución preparada con células cancerígenas humanas. La dosis s.c. de LTZ fue de 10 µg/día, de 100µg de TMX 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 TMX, con el tratamiento de LTZ + TMX, 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 TMX solo o combinado. Estos hallazgos lo convierten el agente más potente de aquellos estudiados en modelos de roedores.

A. S. Bhatnagar y col., (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 esteroideos: LTZ, Anastrozol (ATZ) y Fadrozol (FDZ) 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 que LTZ fue consistentemente 10-30 veces más potente que cualquier otro tratamiento inhibiendo intracelularmente a la enzima aromatasa, en los tres tejidos analizados.

Brodie y col., (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 TMX (60 μ /día) y faslodex (FSX) (70 μ g/week), los inhibidores de aromatasa LTZ (10 μ /día) y ATZ (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 y col., (2003) usando el mismo modelo, estudiaron los efectos de los inhibidores de aromatasa: LTZ y ATZ, así como, el de los antiestrógenos TMX Y Fulvestrant in vivo. Encontraron que los inhibidores de

aromatasa fueron más efectivos que TMX 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 TMX. La combinación LTZ+TMX 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 sino 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 TMX 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 X. D. y col., (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.

VALERATO DE ESTRADIOL Y EFECTOS SOBRE EL HIPOTÁLAMO

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 anovulación crónica, cornificación vaginal persistente y ovarios poliquísticos (Brawer y col., 1978; Brawer y col., 1986). Este tratamiento único también inicia una lesión multifocal a lo largo del núcleo arcuato hipotalámico (NAH). Dentro del foco de lesión, la microscopía electrónica

demuestra la presencia de elementos neuronales en degeneración, así como células microgliales reactivas y una variedad inusual de astrocitos reactivos. Si los ovarios son removidos antes de la aplicación de VE, la lesión no ocurre (Brawer y col., 1980), indicando que la patología evoluciona en respuesta a una exposición ininterrumpida a concentraciones de E2, producidas por los ovarios como resultado de la agresión inicial del VE hacia el eje neuroendocrino.

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 la exposición constante a altos niveles plasmáticos de estradiol provoca un efecto neurotóxico selectivo sobre neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato.

La regulación de la liberación de GnRH es afectada de manera nociva ante la exposición prolongada de estas neuronas al estradiol, durante la condición de ovarios poliquísticos, producida por la administración de una sola dosis de VE (2mg). Al parecer, la activación incrementada 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. Los ovarios poliquísticos además, se correlacionan con incremento en la secreción de andrógenos, incremento en la actividad de la enzima aromatasa y por ende en los niveles de estradiol, el desarrollo de folículos prequísticos, y un decremento en la proporción ovulatoria.

Posterior a este evento periférico ocasionado por el VE, a nivel central, este esteroide actúa de manera indirecta sobre neuronas hipotalámicas a través de péptidos que regulan la liberación de gonadotropinas. Por su parte el mecanismo que subyace a la deficiencia de neuronas β -endorfinérgicas involucra la conversión de estradiol a catecol estrógeno y la subsecuente oxidación a radicales libres o-semiquinonas. La pérdida de neuronas β -endorfinérgicas inducida por el

estradiol provoca un incremento compensatorio en ligandos opioides μ en el Área Preóptica Medial (APM) volviendo a ésta área supersensible a residuos de β -endorfinas o a otros opioides endógenos. La consecuente y persistente inhibición opioide, da como resultado una cascada de déficits neuroendocrinos que finalmente son expresados como un patrón crónicamente atenuado de LH plasmático. 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. Brawer y col., (1993) descubrieron esta acción patológica usando una sola dosis de VE, y encontraron que dicha patología realmente se desarrolla en respuesta a niveles fisiológicos de estradiol (Brawer y col., 1980; Brawer y col., 1983).

Brawer (1978), sostiene 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 NAH. De hecho, 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.

Brawer 1978, demostró la aparición de una lesión 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 este núcleo con el APM, ya que: 1) déficits reproductivos idénticos ocurren tras una desconexión quirúrgica del NAH con el APM, y 2) la degeneración dentro del NAH 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.

Con el fin de estudiar los efectos de una sola inyección de VE sobre el NAH y sobre la función reproductiva en la rata hembra, este autor (Brawer, 1978) 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. Este proceso patológico fue gradualmente progresivo, hasta los 6 meses post-VE. 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, 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 Prolactina (PRL) tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos. Las concentraciones plasmáticas de Hormona del Crecimiento (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 NAH 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 sea directamente responsable de los cambios patológicos en dicho núcleo, ya que el estradiol medido en plasma es producido por los ovarios.

Por su parte es aceptado desde hace mucho tiempo que las hormonas ováricas también juegan un importante rol en el envejecimiento reproductivo normal en roedores. Brawer y col., (1980), evaluaron los efectos del VE y exposición constante a la luz, sobre el aspecto histológico del NAH, en ratas hembras. Encontraron que ambas manipulaciones experimentales, incrementan dramáticamente el número de reacciones en microglia y astrocitos, y que la ovariectomía al grupo control previno la reacción glial. Por ello los autores deducen que el VE es capaz de desencadenar la secreción de un producto oxidativo ovárico que es selectivamente tóxico al NAH, sugiriendo que precisamente los estrógenos endógenos serían el agente neuropatológico, específicamente el estradiol.

Schipper y col., (1981), al realizar su estudio e interesados por el rol de las gónadas en el envejecimiento histológico del NAH, 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 NAH 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 a Estradiol (E2) presentes en células del NAH 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 NAH de ratas envejecidas, se asocian con degeneración neuronal.

Desjardins (1990), teniendo en consideración los antecedentes de que anovulación crónica y ovarios poliquísticos (OP) ocurren en la rata como consecuencia de una sola inyección de VE (Brawer y col., 1986) y que el tratamiento con estradiol produce un defecto permanente a nivel hipotalámico, dando por resultado un patrón aberrante en la liberación de LHRH, mismo que provoca un patrón anómalo de LH, al cual los ovarios responden volviéndose poliquísticos; así como atendiendo un gran número de evidencias provenientes de diversos laboratorios, las cuales sugieren que el daño primario hipotalámico involucra a neuronas productoras de opioides endógenos, los cuales son potentes inhibidores de la liberación de LH bajo una gran variedad de condiciones, realizó el siguiente estudio con el fin de esclarecer el rol del sistema opioide hipotalámico en ovarios poliquísticos inducidos por el VE. Para determinar la selectividad de los receptores y localización precisa de la elevación en ligandos tras el tratamiento con VE, emplearon autoradiografía in vitro, empleando ligandos específicos para receptores opioides μ , δ y κ . Y debido a que la β -endorfina ha sido específicamente implicada en la supresión de secreción gonadotrópica, también midieron concentraciones de β -endorfinas en hipotálamo de animales a los cuales se les indujo OP con VE. Sus resultados indican que 8 semanas post-VE se produce una elevación altamente específica de receptores μ en una región restringida del APM, concurrente con una reducción en la concentración de β -endorfinas. Así mismo, sus datos señalan que el APM y el núcleo supraquiasmático exhibieron un marcaje μ -opioide denso, el núcleo hipotalámico anterior y ventromedial fueron moderadamente marcados, mientras que el núcleo arcuato, dorsomedial y magnocelular mostraron un marcaje muy esparcido, en animales tratados con VE. Por su parte las concentraciones hipotalámicas de β -endorfinas medidas por RIA fueron significativamente menores en estos sujetos. Así mismo sus hallazgos indican que el incremento en ligandos es atribuible a una elevación selectiva en receptores opioides μ y que están localizados

predominantemente en el APM y antero ventral preóptica de animales tratados con VE. Dado que estas áreas corresponden a regiones en las cuales los cuerpos celulares LHRH son localizados, los resultados observados, apoyan la hipótesis de que el defecto hipotalámico subyacente a la oleada suprimida de LH en ratas tratadas con VE, es debido a la hipersensibilidad de neuronas LHRH hacia la acción inhibitoria de opioides endógenos.

La demostración de contactos sinápticos entre axones inmunoreactivos a β -endorfinas y neuronas LHRH en el APM hace posible esta teoría. El incremento observado en los ligandos para receptores opioides μ podría ser el resultado de una liberación disminuida de β -endorfinas en el APM. En conclusión este estudio apoya el que los OP inducidos por el VE podrían resultar de una sobrerregulación crónica de receptores μ -opioides sobre y/o en la vecindad de neuronas LHRH volviéndolas susceptibles a la inhibición opioide. La condición de ovarios poliquísticos inducidos por el VE remeda en varios aspectos la condición ovárica multifolicular vista en mujeres con amenorrea hipotalámica, por lo que es importante considerar que el sistema opioide hipotalámico parece jugar un rol clave en este tipo de patología ovárica.

Desjardins y col., (1992), teniendo 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 peroxidas positivos locales, examinó si el tratamiento con el antioxidante vitamina E, protegía a neuronas β -endorfinérgicas de la acción neurotóxica del estradiol. Sus resultados 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. La vulnerabilidad única de neuronas β -endorfinérgicas podría ser el resultado de una variedad de factores, incluyendo una insuficiencia selectiva

en las 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 roles fisiológicos bien establecidos, los esteroides, actúan como neurotoxinas selectivas.

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. El tratamiento con VE resultó en reducciones significativas en las concentraciones de β -endorfinas hipotalámicas, consistente con pérdida de células, en contraste animales tratados concomitantemente con VE y vitamina E, que 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 ciclos estrales normales. El mantenimiento en las concentraciones de β -endorfinas en ratas tratadas con VE+vitamina E sugiere que el antioxidante previno la pérdida de neuronas β -endorfinérgicas inducida por estradiol. 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.

Desjardins (1993), examinó 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 NAH, 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. Aún 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. Sus resultados confirman la selectividad de los efectos del estradiol sobre la población celular de β -endorfinas y demuestran que el decremento observado en inmunoreactividad para β -endorfinas refleja pérdida celular real. 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. 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. El conteo de neuronas inmunopositivas para β -endorfinas del núcleo arcuato, demostró una reducción del 60% en animales tratados con VE, en comparación con los controles. Los hallazgos de este estudio demuestran que la exposición a concentraciones plasmáticas altas o farmacológicas bajas de estradiol, iniciadas por el tratamiento por el VE, da como resultado una destrucción selectiva de neuronas β -endorfinérgicas dentro del arcuato, mientras que no afecta a otras poblaciones neuronales coextensivas.

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 y col., 1978; Schipper H. M. Y col., 1990). Estos astrocitos identificados tanto en el cerebro de la rata como en el humano, puede transformar catecol-estrógenos, generados espontáneamente en el cerebro a partir del estradiol circulante, a radicales libres o-semiquinonas (Schipper y col., 1991). Éstos radicales libres podrían, a su vez, causar peroxidación lipídica de la membrana neuronal y eventualmente provocar muerte celular.

CIRCUITOS NEURONALES AFECTADOS POR LA TOXICIDAD DEL VE

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 APM 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 y Col., 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 y Col., 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, 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, 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 patrón plasmático de LH (Brawer y col, 1993; Desjardins, 1990). Una explicación para esta incongruencia involucra una respuesta específica de las células diana β -endorfinérgicas en el APM 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 APM densamente poblada con neuronas GnRH, sugiriendo que los elementos diana para β -endorfinas en el APM, posiblemente las células GnRH, exhiben una sobrerregulación compensatoria de sitios de ligandos μ en respuesta a la deaferentación parcial. Esto podría volver a estas células supersensibles a residuos de β -endorfinas o hacia otros ligandos μ endógenos como la Met-enkefalina. Así, la inhibición opioide crónica resultante podría relacionarse con el patrón suprimido en plasma de LH, característico de las ratas tratadas con VE. Además de la pérdida de células β -endorfinérgicas, ocurren otros cambios en el núcleo arcuato hipotalámico posteriores al tratamiento con VE, observándose una significativa, aunque transitoria reducción en el número de sinapsis axo-somáticas y axo-dendríticas.

MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ESTRADIOL

Hasta ahora no se ha logrado establecer claramente cómo y porqué el estrógeno es selectivamente patógeno al NAH, ya que algunas células diana para estradiol en dicho núcleo, como aquellas que expresan tirosina hidroxilasa 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, 1980, 1978).

Schipper (1991), estudió la toxicidad causada por estrógenos, por medio de un estudio realizado en cultivos celulares en la única población de astrocitos periventriculares del NAH, 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), fue 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 peroxidativa al catalizar la formación de radicales libres citotóxicos, podría mediar el efecto patológico que el E2 ejerce en el NAH.

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

El síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) afecta al 4% de las mujeres en edad reproductiva, 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 centrales 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 y col., 2003, reportan que el sello distintivo de esta patología 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. Sin embargo se cree que este síndrome conlleva un gran número de factores y su desarrollo puede estar asociado a disturbios en la generación de pulsos hipotalámicos GnRH, observándose que éstos son demasiado frecuentes, favoreciendo así la secreción de LH, y disminuyendo en consecuencia la de FSH.

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 y col., 1997).

Paredes (1998), menciona 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 registró 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 período, 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 y col., (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 apoyan que la exposición constante a altos niveles plasmáticos de estradiol provoca un efecto neurotóxico sobre neuronas hipotalámicas, incluyendo a las neuronas del NAH. 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 evidencia obtenida de pacientes humanos con SOP, la cual sugiere fuertemente un tono noradrenérgico hipotalámico incrementado y una actividad dopaminérgica decrementada.

Barria A y col., (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 β -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 β -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 β -adenérgica y de gonadotropinas, también esta técnica reduce los elevados niveles de NA ovárica resultante del tratamiento con VE y causa sobrerregulación de los adrenorreceptores β ; 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 y col., (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 (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 post-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.

Dissen y col., (2000), apegados también al modelo de inducción de ovarios poliquísticos a través del VE, comentan que precediendo el desarrollo de 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.

Carriere (1989), enfatiza 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 patrón 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.

Desjardins y col., (1993 y 1990) y Brawer y col., (1978), ha indicado que en el desarrollo de ovarios poliquísticos, producto de la disfunción hipotalámica, están fuertemente involucradas células opioidérgicas. Algunos otros autores señalan que los opioides son potentes inhibidores de la liberación cerebroespinal de LH bajo una variedad de condiciones (Kalra y col., 1988). Cuando han estudiado el APM, encuentran que el número de ligandos opioides se encuentra elevado cuando a sujetos experimentales se les induce SOP a través de una sola dosis de VE, haciendo posible deducir que tal vez el sistema opioide se encuentra hipersensible hacia los pulsos acelerados de LH, y cuando las ratas tratadas con VE reciben tratamiento con naltrexona, inmediatamente se observa una elevación de receptores LHRH hipofisarios, y se puede ver una mejoría en la morfología ovárica (Carriere y Brawer, 1989).

Marinelli y col., (2003) y Reid y col., (2003), en sus más recientes estudios inducen SOP en ratas intactas tratadas con VE dosis única (2mg), y reportan la ocurrencia de elevaciones en el estrógeno plasmático a las dos semanas post-VE, este efecto se prolonga meses, lo cual hace señalarlo como efecto causal de la lesión gradual y selectiva hacia neuronas POMC hipotalámicas, paralela a reducción en los niveles de β -end en el NAH.

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 intentado correlacionar el decremento en concentraciones de β -endorfinas hipotalámicas con variaciones en consumo de alcohol en modelos experimentales, para lo cual han administrado dosis 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 rol 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 JP y col., 1992; 1993; Gianoulakis C y col., 1989; Rasmussen DD. Y col., 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 col, 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 (Hubell CL y col., 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 y col., 1996). Parece que 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 extensas, incluyendo proyecciones rostrales al diencefalo periventricular, telencéfalo y muchos otros núcleos hipotalámicos (Tsou K. y col., 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.

El hecho de que el tratamiento con VE produce 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 vuelve al VE una herramienta interesante para examinar el rol 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 (2000), teniendo en cuenta que el sistema opioide endógeno, especialmente las β -endorfinas, pueden jugar un rol 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 propuso revelar el rol 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. Ratones 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, estos ratones fueron sometidos 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 rol en algunos, pero no en todos los efectos conductuales del etanol.

Reid (2002), motivado por hallazgos previos en los cuales se confirma que una sola inyección de VE, produce daño selectivo a neuronas hipotalámicas secretoras de β -endorfinas, y considerando que este tratamiento se podrían emplear como modelo para medir el rol de las β -endorfinas en procesos relacionados con el abuso de alcohol o alcoholismo, realizó 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 cambios en el peso corporal de los sujetos tratados con VE, consistiendo 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 período, 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 tal 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 (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 (Marinelli y col., 2003; Reid y col., 2003; Camargo y col., 2005).

Reid (2003) realizó otras investigaciones recientemente, 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. Sin embargo, la cantidad de endulzante fue una condición importante en el consumo de etanol.

Marinelli y col (2003), en su trabajo experimental investigó 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 hipofisario 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 este 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 los niveles de éste péptido, observándose que en general decrementó los niveles de β -endorfinas. En la pituitaria anterior y en hipotálamo hubo un efecto importante y fuerte ya que se observaron niveles más elevados de β -endorfinas en ratas Wistar que en ratas Lewis. Ambas líneas de ratas tratadas con VE mostraron un incremento en el consumo de etanol VS los grupos controles, efecto que para los autores no involucra niveles de β -endorfinas. Ellos señalan que el mayor consumo del etanol por ratas Wistar podría deberse a 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.

Por su parte, Camargo y col. (2005), al emplear este mismo modelo experimental con la finalidad de observar cambios en los patrones de consumo voluntario de etanol y sobre la población de neuronas β -end, trataron a hembras intactas que presentaron ciclos estrales regulares, con VE (2mg) y expusieron al consumo de etanol de manera ininterrumpida a los sujetos, con consumos cada tercer día, antes y después del VE. Ellos encuentran que entre las semanas 4 y 5 post-VE, se incrementaron significativamente los consumos, y detectaron que el grupo control mostró una población de neuronas β -end mucho mayor que la de los sujetos tratados con VE. Es importante mencionar que en este proyecto las bebidas solo contuvieron agua y alcohol, por lo cual el efecto observado es independiente del contenido endulzante de la solución consumida.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos estudios 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 POMC hipotalámico, el cual involucra la síntesis de β -endorfinas. Dado que varias líneas de investigación implican la actividad del sistema de β -endorfinas en la mediación del consumo de etanol (De waele J. P. y col., 1994; Froehlich J. C. y col.; 1990; Marinelli y col., 2000), es probable que el estradiol pueda alterar el consumo en ratas vía su efecto sobre neuronas β -endorfinérgicas hipotalámicas.

El sistema opioide y el consumo de alcohol han sido relacionados de manera estrecha en base a investigaciones experimentales formales, las cuales sostienen que la administración de esta droga incrementa la liberación de péptidos opioides a nivel hipotalámico en roedores (Gianoulakis, 1990). El etanol modifica las propiedades de ligandos de receptores opioides así como la síntesis y secreción de opioides endógenos (De Waele J. P. y col., 1992; 1993; Gianoulakis C. y col., 1989; Rasmussen D. D. y col., 1998). La activación del sistema opioide se ha relacionado con las propiedades recompensantes del alcohol.

En correlación con esto, Genazzani y col., (1982), indican que alcohólicos crónicos presentan niveles bajos de β -end en líquido cefalorraquídeo y por ende suponen que la adicción al alcohol podría ser inducida a través de un mecanismo que involucra a los péptidos opioides y sus receptores. Series de experimentos han investigado los efectos de una sola inyección de Valerato de Estradiol en ratas hembras sobre el consumo del alcohol. Las observaciones sugieren que el comienzo del estro persistente asociado con ovarios poliquísticos tras la aplicación de una sola dosis de VE (2 mg) desencadenan paralelamente una lesión neuronal

identificable en el núcleo arcuato hipotalámico, específicamente reducción de hasta un 60% en neuronas β -endorfinérgicas. (Brawer J. R. y col., 1993; 1980; Desjardins G. C. y col., 1992; Schipper y col., 1994; Lara y col., 2000). Juntos estos antecedentes nos proporcionan un modelo interesante que permite estudiar la participación de las β -end en el síndrome de adicción al alcohol.

El análisis del efecto neurofisiológico del VE sobre el consumo voluntario de alcohol en ratas hembras ha arrojado resultados diversos (Marinelli y col., 2003; Reid M. y col., 2003; Reid L. y col., 2002), y recientemente nuestro laboratorio empleó este modelo para estudiar la relación entre el consumo de alcohol y las modificaciones en el contenido de β -end a nivel hipotalámico (Camargo y col., 2005) encontrando que el VE indujo una disminución marcada en el número de neuronas β -endorfinérgicas del NAH, paralelo a un incremento significativo en el consumo de etanol, en las semanas 4 y 5 posteriores a la inyección de VE.

A pesar de que se ha planteado que al parecer los estrógenos endógenos producidos por los ovarios poliquísticos son los principales responsables de la citotoxicidad en neuronas β -endorfinérgicas, hasta donde sabemos no hay ningún estudio que analice directamente su participación en este mecanismo y tampoco sobre el efecto que la inhibición de estrógenos endógenos puede tener en el consumo del alcohol. Con base en lo anterior, el presente estudio pretende analizar 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 arcuato hipotalámico, a través de la inhibición de la biosíntesis estrogénica empleando un inhibidor de aromatasa.

Con esta base nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general:

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

Objetivos particulares:

Estudiar patrones de consumo de alcohol en el modelo de citotoxicidad en hipotálamo, producido por la administración de VE.

Observar la acción del valerato de Estradiol sobre el ciclo estral de los sujetos experimentales.

Detectar por medio de la aplicación de un inhibidor de aromatasa si la citotoxicidad es debida a la sobreestrogenización que ocurre como secuela del tratamiento con VE.

Evaluar en el curso temporal del experimento, los niveles plasmáticos de Estradiol y Testosterona, para estudiar sus cambios debidos a los tratamientos farmacológicos.

Valorar la formación de quistes ováricos como resultado de la aplicación de VE, y su posible menoscabo en el grupo tratado con el inhibidor un aromatasa.

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

Las hipótesis planteadas a partir de la base teórica presentada son:

- Al administrar una sola dosis de Valerato de Estradiol:

A partir del segundo mes de administrado, habrá reducción en el número de neuronas β -endorfinérgicas en el núcleo arcuato hipotalámico, se incrementará el consumo del alcohol, provocará ovarios poliquísticos, y los niveles plasmáticos de estradiol serán mayores a los del grupo tratado con un inhibidor de aromatasa.

- El bloqueo de la acción estrogénica a través de un inhibidor de aromatasa:

Inhibirá el incremento en el consumo del alcohol producido por el Valerato de Estradiol, impedirá la reducción en el número de neuronas β -endorfinérgicas, reducirá el daño a nivel de ovarios, decrementará los niveles de estradiol en plasma e incrementará los niveles plasmáticos de testosterona en relación al grupo tratado sólo con VE.

MÉTODOS

SUJETOS

Se utilizaron 24 ratas hembras Wistar, adultos jóvenes de 70 días de edad, procedentes de 4 camadas diferentes del laboratorio de farmacología del instituto de neurociencias. Hubo dos grupos con n=12, los sujetos se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad, 12/12hrs, con alimento ad libitum (croquetas Ralston Rations, Purina).

CONDICIONES DE LABORATORIO

Estos sujetos se colocaron en cajas individuales, de 18 cm. de ancho x 27 cm. de alto, con una temperatura entre 22 y 24°C.

ASIGNACIÓN DE LOS SUJETOS A LOS GRUPOS

Para asignar a los sujetos a ambos grupos se ordenaron 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 hembras tratadas con VE a las cuales 21 días después se les aplicó un inhibidor de aromatasa. El segundo grupo representa a los sujetos controles, hembras tratadas con VE a las cuales 21 días después se les aplicó vehículo.

Se seleccionó a los sujetos que presentaron por lo menos dos periodos regulares de estro completo y las fases del ciclo estral fueron monitoreadas durante el transcurso de todo el experimento, por medio de citología vaginal.

VARIABLES INDEPENDIENTES:

- Valerato de Estradiol (2 mg en 0.2 ml de aceite, inyección única) en sujetos con ovarios intactos.
- Aplicación de un inhibidor de aromatasa no esteroide (Letrozol, 250 µg/kg/día).

VARIABLES DEPENDIENTES:

- Consumo de alcohol durante el tiempo (valores de consumo).
- Peso corporal de los sujetos.
- Consumo de alimento.
- Ciclo estral.
- Niveles de ambas hormonas: estrógenos y andrógenos (testosterona y estradiol).
- Quistes ováricos.
- Población de neuronas β -endorfinérgicas

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

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 %). Este procedimiento es ampliamente usado en este tipo de modelos experimentales, con la única intención de que los sujetos se familiaricen con el sabor de la preparación, y que al tomar los datos de una línea base posterior, este estímulo no resulte aversivo, por ello se presenta en concentraciones crecientes.

LINEA BASE

Catorce días previos a la inyección de VE, 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, durante 15 días.

PESO, AGUA Y ALIMENTO

Diariamente se midió la ingesta de alimento en gr., así como el consumo de agua en ml., y el peso fue monitoreado 3 veces por semana.

TRATAMIENTO CON ESTRÓGENOS

Se administró Valerato de Estradiol VE (2 mg en 0.2 ml de aceite, Primogyn Depot SCHERING) inyección única; vía intramuscular a ambos grupos. Este fármaco se dejó actuar por tres semanas en las cuales los sujetos no tuvieron acceso al alcohol, solamente, a agua y alimento.

TRATAMIENTO CON LETROZOL

Se aplicó al grupo 1, el inhibidor de aromatasa Letrozol (250 µg/kg/día por vía s.c.), tres semanas después de haberse aplicado el VE, y el grupo control recibió vehículo (hidroxi-propil-celulosa + agua inyectable). Estos tratamientos tuvieron una duración de 9 semanas, basándonos en la metodología previamente establecida por otros estudios, acerca de que, la lesión neuronal específica sobre células POMC del núcleo arcuato hipotalámico es evidente a los dos meses post-VE y se sostiene por un periodo prolongado.

POST-TRATAMIENTO CON ALCOHOL

Los sujetos se expusieron nuevamente al alcohol (concentración al 10%), a los 28 días de haber recibido el VE, y 7 días después de haber iniciado el tratamiento con Letrozol. Sus consumos se registraron diariamente en las 9 semanas subsecuentes.

CITOLOGÍA VAGINAL

Se evaluó la ciclicidad de los sujetos por medio de frotis vaginal, durante 2 ciclos consecutivos, previos a la aplicación de la inyección de VE, y durante los dos meses del desarrollo del experimento (4 veces a la semana, entre 4 y 5 días continuos); tomando en cuenta la secuencia del ciclo estral en la rata (etapas: proestro, estro, metaestro y diestro) esto con la intención de explorar los cambios en la ciclicidad estral como consecuencia de la administración de VE en ambos grupos.

CUANTIFICACION DE NIVELES DE ESTROGENOS Y ANDROGENOS EN PLASMA

Se cuantificaron niveles hormonales en plasma de estradiol (E2) y testosterona (T), en las diversas etapas del estudio, el primer análisis se hizo antes de iniciar con Letrozol (LTZ)(48 h)(basal), la segunda medición se realizó 3 semanas después de iniciado el tratamiento Ltz, la tercera toma de muestras ocurrió a las 6 semanas de transcurrido el tratamiento y la cuarta toma se hizo al final de este tratamiento (9 semanas de ejecución), la última muestra se obtuvo el día de la perfusión por punción cardiaca.

Las muestras sanguíneas se extrajeron de las venas laterales de la cola de los sujetos (vena caudal) previa anestesia superficial con pentobarbital sódico 0.02556gr/Kg, diluido en 0.2 ml de solución salina fisiológica, vía intra peritoneal

(i.p.). Las muestras obtenidas se depositaron en tubos que contenían ácido etil diamino tetraacético di-sódico (EDTA-2Na Sigma-ED2SC) como anticoagulante a una concentración del 5% y se homogenizo con agitación orbital suave para después centrifugarla a 3500 RPM durante 30 min, a 4°C, separando la fase sólida (paquete globular) y la fase líquida (plasma), la que fué utilizada para las cuantificaciones hormonales. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento inmunoenzimático correspondiente.

ESTRADIOL (E2)

Para medir la concentración plasmática de E2 se utilizó el Kit comercial de Biosource (Cytoscreen E2-EIA), el que tiene por fundamento la base de un ligando competitivo de inmunoanálisis para determinar cuantitativamente esta hormona en suero y plasma. E2-EIA es un análisis inmunoenzimático diseñado en un plato micro posillo. Una cantidad fijada de estradiol marcado con una peroxidasa, compite con estradiol sin marcaje presente en los estándares o en las muestras, por un número limitado de sitios de ligandos de un anticuerpo específico. Complejo anticuerpo E2-HRP es fijado simultáneamente sobre los pozos del plato micro posillo, cubierto con un exceso de IgG's de anti-conejo. Efectuando una reacción antígeno-anticuerpo de alta especificidad. Transcurridas dos horas de incubación a temperatura ambiente, los micro posillos son lavados para detener la reacción de competición. Después se añadió la solución de tetrametilbenzidina (substrato [TMB-H₂O₂] Sigma T-2885) y se incubó por 30 min. Posteriormente se detuvo la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color de reacción del sustrato es inversamente proporcional a la concentración de E2 en la muestra. Para la obtención de los valores numéricos (concentraciones de E2) se trazó una curva estándar y se determinó la concentración de E2 por interpolación de la curva estándar.

TESTOSTERONA (T)

La cuantificación de T se realizó empleando un Kit de análisis inmuno-enzimático (Correlate-EIA; Testosterona; Catalog No. 901-065), el cual utiliza un inmuno-análisis competitivo para la determinación cuantitativa de testosterona en fluidos biológicos. El Kit utiliza un anticuerpo monoclonal para que la testosterona sea unida de forma competitiva, ya sea T en los estándares, muestras o ha una molécula fosfatasa alcalina la cual tiene T covalentemente unida a él. Después de una incubación simultánea a temperatura ambiente, se lavan los excesos de los reactivos y se añade el sustrato. Posterior a un breve periodo de incubación la reacción enzimática se detiene y el color amarillo generado previamente, torna a una tonalidad roja que se lee a 405 nm. La concentración de la coloración del producto final de reacción es inversamente proporcional a la concentración de testosterona en los estándares y las muestras.

ESTUDIOS CUALITATIVOS DE OVARIOS

Los ovarios se sometieron a un análisis microscópico morfológico-descriptivo para detectar parámetros histológicos que indiquen la formación de quistes, como: hiperplasia, vesículas con contenido seroso, grosor de la pared y cápsula albugínea, presencia de focos hemorrágicos, etc.

PERFUSIÓN

Los sujetos se sacrificaron mediante perfusión intravascular, bajo anestesia profunda por inyección i.p. 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 pinzó 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 administró 250 ml de una solución lavadora a temperatura corporal, compuesta por 0.9% de solución salina isotónica con 1 gr. de procaína (sigma P-9879) y 1,000 µl de heparina/litro (Sigma H-3393), bajo presión de 120 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 580 mosm/l. Posteriormente se decapitó a los sujetos y los cerebros fueron extraídos.

CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE NEURONAS INMUNOREACTIVAS A B-ENDORFINAS (B-END)

Objetivo: Evaluar la población de neuronas inmunoreactivas a β -end en la región del núcleo arcuato.

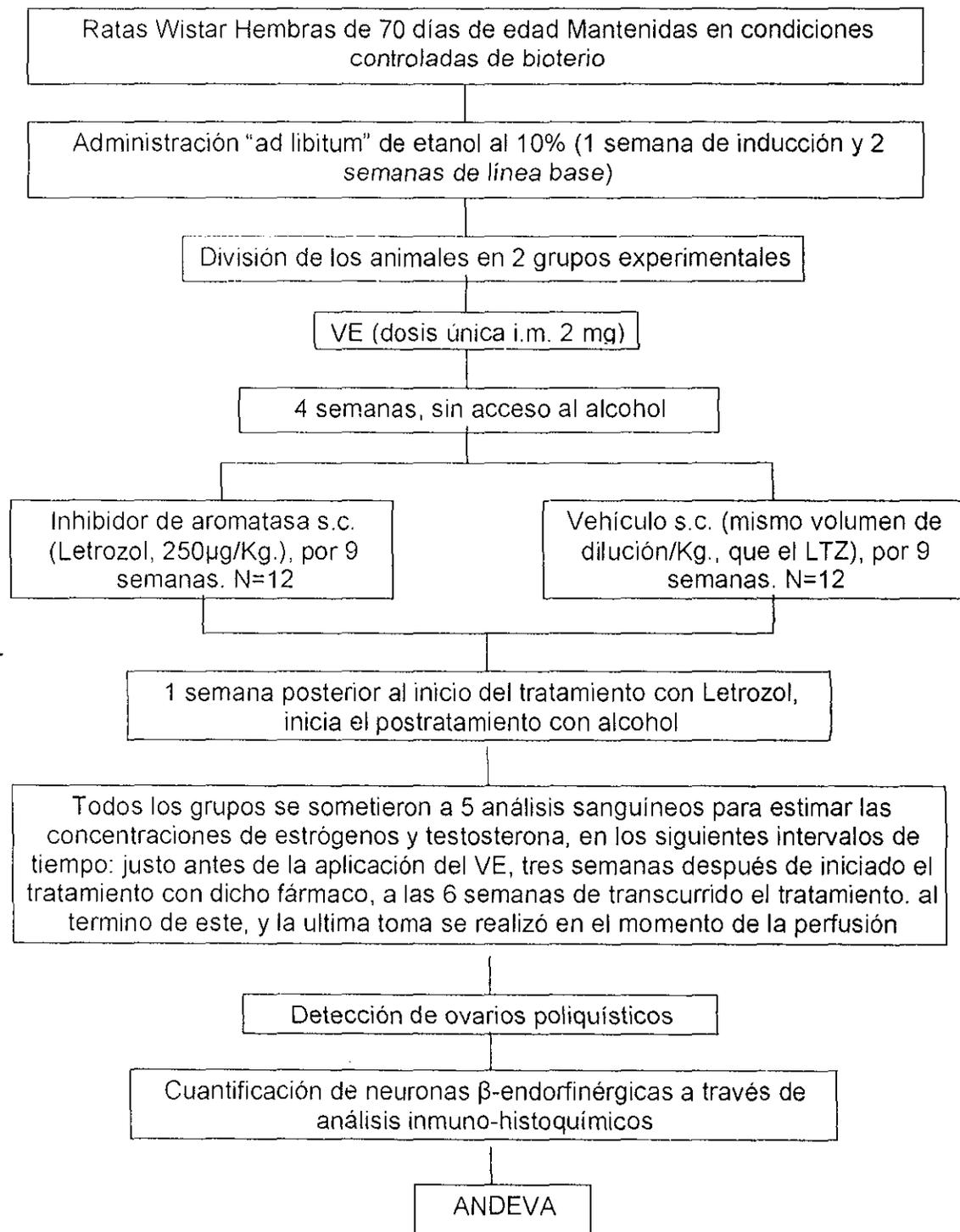
Una vez realizado el sacrificio, perfusión y crioprotección de los cerebros, se realizaron tres cambios sucesivos de 60 min en PBS en los cortes coronales cortados a un espesor de 50 µm en un crióstato. En estos tejidos se efectuó un estudio para identificar la inmunoreactividad en neuronas inmunopositivas a β -end.

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA B-ENDORFINAS

Con ayuda de un crióstato (Leica CM1850) se realizaron cortes de 50 µm de espesor en los tejidos previamente crioprotegidos. 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 µl a cada portaobjetos de suero normal de cabra al 3% en PBS 0.1 M, incubándose por 20 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se aplicó el anticuerpo (Ac) primario. El Ac primario fue

policlonal, generado en conejo contra β -end. de rata (inmunógeno) (cat. T-4045 Lab. Peninsula) 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 biotinilado generado en cabra contra IgG de conejo en dilución 1:250 incubándolo 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 obtener 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 μ m² a 500 aumentos en ensayo de doble ciego.



RESULTADOS

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON VALERATO DE ESTRADIOL Y LETROZOL SOBRE EL CONSUMO DEL ETANOL

Los datos arrojados por ambos grupos se agruparon en bloques por semanas (7 días/sem) durante la línea base (unimos los consumo de ambas semanas) y las 9 semanas post-VE. Para realizar el análisis estadístico empleamos un ANDEVA 2 factores (tratamiento por periodo), diseño mixto de parcelas divididas. El consumo de etanol se expresó en gr/kg de peso corporal, y fue reiniciado a partir de la segunda semana con Letrozol o Vehículo y tuvo una duración de 9 semanas, periodo al cual nos referimos como post-tratamiento con alcohol.

El factor B, semanas, fue significativo ($F(9, 198) = 7.25, P = 0.0001$) y el análisis posterior (Duncan 5%), mostró que la semana 1 post-tratamiento fue significativamente mayor que todas las semanas y tanto la LB como la semana 2 post-tratamiento fueron significativamente mayores que las semanas 8, 9 y 10 (Fig. 1).

Es decir claramente el análisis a posteriori indica que los consumos fueron decreciendo paulatinamente en el tiempo independientemente del tratamiento con Letrozol o Vehículo.

CONSUMO DE ALCOHOL

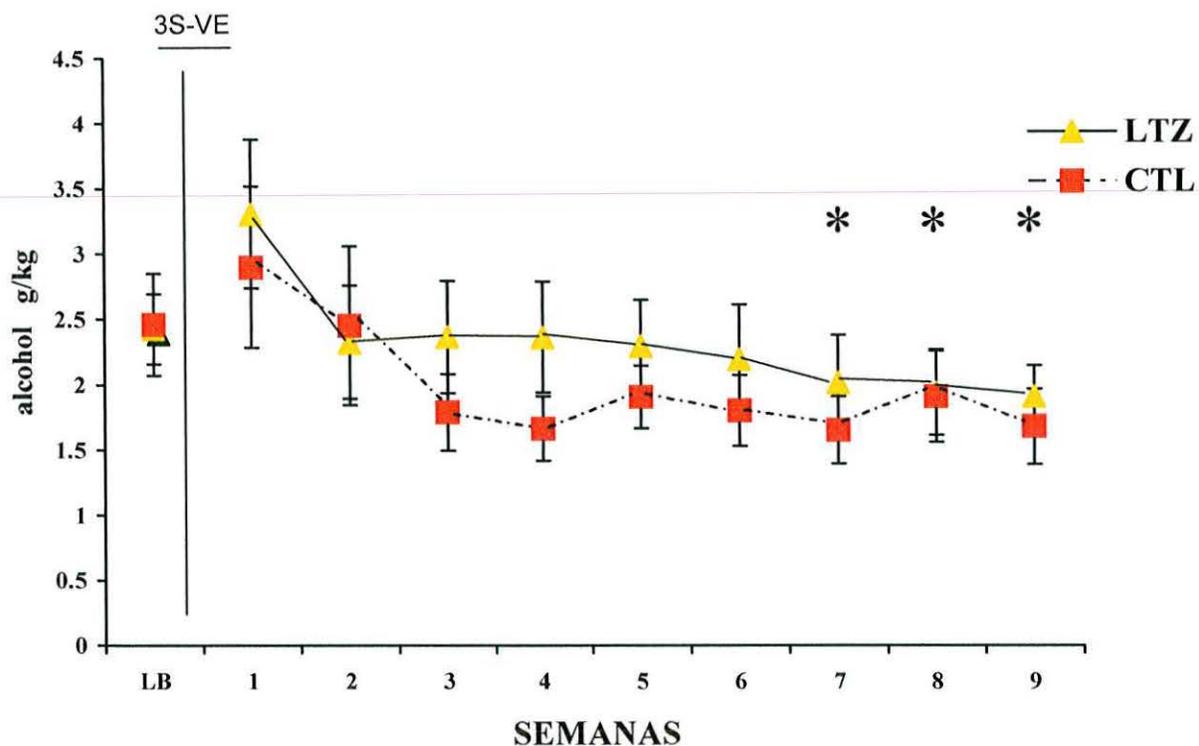


Fig 1. Consumo de alcohol en gr/kg (M±E.S.), grupos letrozol (LTZ) y Control (CTL) en los periodos de Línea Base (LB) y nueve semanas posttratamiento, a partir de la segunda semana de administración con Letrozol (9S-LTZ). Cada punto representa el promedio de 7 días. ANDEVA 2 factores (tratamiento X periodo), diseño mixto de parcelas divididas. Los asteriscos indican de acuerdo a una prueba a posteriori (Duncan 5%) que el consumo de la semana 1 del post-tratamiento con alcohol, fue significativamente mayor que la LB y que todas las demás semanas post-tratamiento; y que las semanas 8, 9 y 10 fueron significativamente menores que la LB y la semana 2 post-tratamiento.

Estos hallazgos indican que ni el tratamiento con la dosis crónica de VE, ni la inhibición de la biosíntesis estrogénica con LTZ, tuvieron repercusión alguna sobre dicha variable. Por su parte el ligero incremento en el consumo de etanol observado en la semana uno del post-tratamiento, lo atribuimos al efecto de retoma, ampliamente documentado en la literatura, ya que, de los siete datos correspondientes al bloque de la semana 1 post-tratamiento, sólo los 2 primeros días fueron mayores, permitiendo que como consecuencia aparezca esta

diferencia estadística. Si se eliminan esos dos datos de dicho bloque no aparecerían diferencias en el factor semanas.

EFFECTO DE AMBOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO, AGUA Y PESO CORPORAL

Nuevamente y dando continuidad a la metodología empleada para el consumo de etanol, los datos fueron agrupados en bloques por semanas (7 días/sem) durante la línea base, 3 semanas post-VE y las 9 semanas post-LTZ. La realización del análisis estadístico fue a través de un ANDEVA 2 factores (tratamiento por periodo), diseño mixto de parcelas divididas. El consumo de alimento se evaluó en gr, y pudimos observar que el VE decrementó el consumo de alimento en la semana siguiente a su aplicación. El factor B, semanas, fue significativo ($F(12, 264)=24.58, P=0.0001$) (fig 2). El análisis posterior (Duncan 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.

CONSUMO DE ALIMENTO

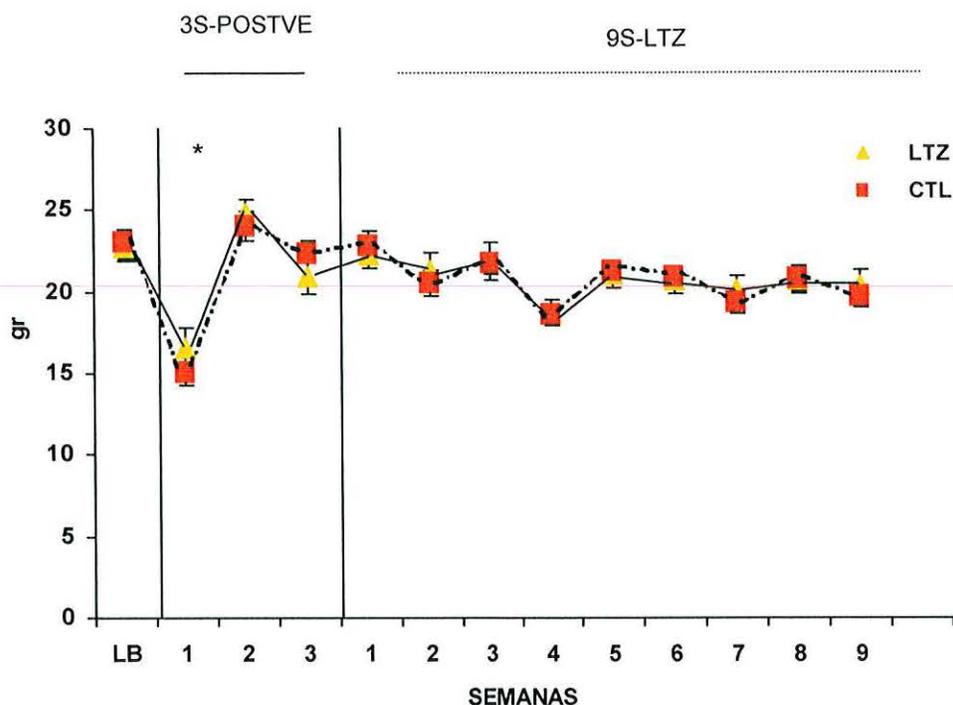


Fig 2. Consumo de alimento en gr. (M±E.S.), grupos Letrozol (LTZ) y Control (CTL); en los periodos de Línea Base (LB) 3 semanas post- tratamiento con valerato de estradiol (Post-VE), y 9 semanas post- tratamiento con letrozol (9S-LTZ). Cada punto representa el promedio de 7 días. ANDEVA 2 factores (tratamiento X periodo), diseño mixto de parcelas divididas. El asterisco indica de acuerdo a una prueba a posteriori (Duncan 5%) que el consumo de alimento en la semana 1 post-VE fue significativamente menor que la LB, que las semanas 2 y 3 post-VE, y las todas las semanas post-LTZ.

A pesar del efecto de VE decremantando el consumo de alimento en la semana 1 posterior a su administración, dicho fármaco no afectó el peso corporal de los sujetos (Fig. 3). Por su parte el tratamiento con Letrozol produjo un ligero incremento en el peso corporal en relación al grupo Vehículo.

Para analizar el peso corporal de los sujetos, agrupamos los datos en bloques por semanas (7 días/sem) durante la línea base, 3 semanas post-VE y las 9 semanas post-LTZ. La realización del análisis estadístico fue a través de un ANDEVA 2

factores (tratamiento por periodo), diseño mixto de parcelas divididas. El factor B, semanas, fue significativo ($F(12, 264)=22.24, P=0.0001$) y el análisis posterior (Duncan 5%), mostró que las semanas 7, 8 y 9 post-LTZ fueron significativamente mayores que la LB, que las tres semanas post-VE y que las 3 primeras semanas post-LTZ (Fig 3).

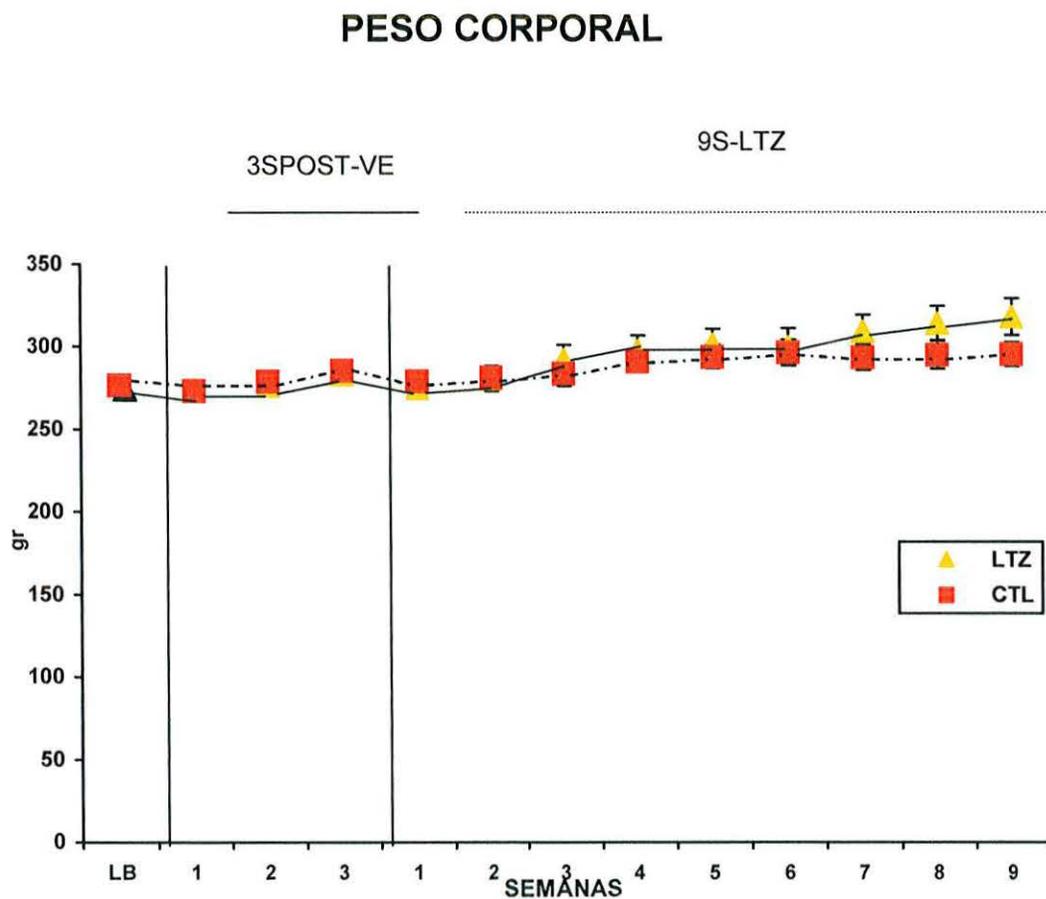


Fig 3. Peso corporal en gr (M±E.S.), grupos Letrozol (LTZ) y Control (CTL); en los periodos de Línea Base (LB) 3 semanas post- tratamiento con valerato de estradiol (Post-VE), y 9 semanas post- tratamiento con letrozol (9S-LTZ). ANDEVA 2 factores (tratamiento X periodo), diseño mixto de parcelas divididas. Los asteriscos indican de acuerdo a una prueba a posteriori (Duncan 5%) que el peso corporal en la las semanas 7, 8 y 9 post-LTZ fueron significativamente mayores que la LB, que las tres semanas post-VE y que las 3 primeras semanas post-LTZ.

Los consumos de agua tendieron a ser mayores en los sujetos que conforman el grupo 2 (VE+Vh). De esta manera, analizamos el consumo de agua en ml., agrupando los datos en bloques por semanas (7 días/sem) durante la línea base, 3 semanas post-VE y las 9 semanas post-LTZ. La realización del análisis estadístico fue a través de un ANDEVA 2 factores (tratamiento por periodo), diseño mixto de parcelas divididas. El factor B, semanas, fue significativo ($F(12,264)=20.65$, $P=0.0001$) y el análisis posterior (Duncan 5%), mostró que la semana 1 post-LTZ fue significativamente mayor que las semanas 1 y 3 post-VE, y que las semanas 2 a la 9 post-LTZ; así mismo este análisis a posteriori muestra que la semana 2 post-VE fue significativamente mayor que la LB, la semana 1 post-VE y todas las semanas post-LTZ; la semana 3 post-VE muestra ser significativamente mayor que la LB, la semana 1 post-VE y todas las semanas post-LTZ; por último las semanas de LB, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 post-LTZ fueron significativamente mayores a las semanas 7 y 9 post-TZ y a la semana 1 post-VE.

AFECCIÓN DE LOS DE LOS NIVELES HORMONALES PLASMÁTICOS POR AMBOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Se cuantificaron niveles hormonales en plasma de estradiol (E2) y testosterona (T), en las diversas etapas del estudio. En esta ocasión, dada la naturaleza de los datos, el análisis estadístico correspondió a una U Man Whitney entre grupos por muestra.

La literatura correspondiente a este modelo de citotoxicidad en el núcleo arcuato hipotalámico, a través de una sola dosis de VE (2mg) ha reportado que los niveles de estradiol plasmáticos se incrementan hasta 50 veces por encima de los valores normales cuando se aplica dicho tratamiento, nosotros, a través de la aplicación del inhibidor de aromatasa (LTZ), esperábamos un decremento drástico en los niveles de E2 en plasma, e incrementara a la par los niveles de Testosterona. Encontramos que dicho fármaco incrementó significativamente la Testosterona (Fig 4) durante el curso del tratamiento con LTZ y redujo de forma mínima los niveles plasmáticos de E2 (Fig 5) en este curso temporal, nuestros hallazgos son consistentes con estudios previos en cuanto al efecto de Letrozol sobre los niveles hormonales en plasma. A continuación se muestran sus respectivas gráficas.

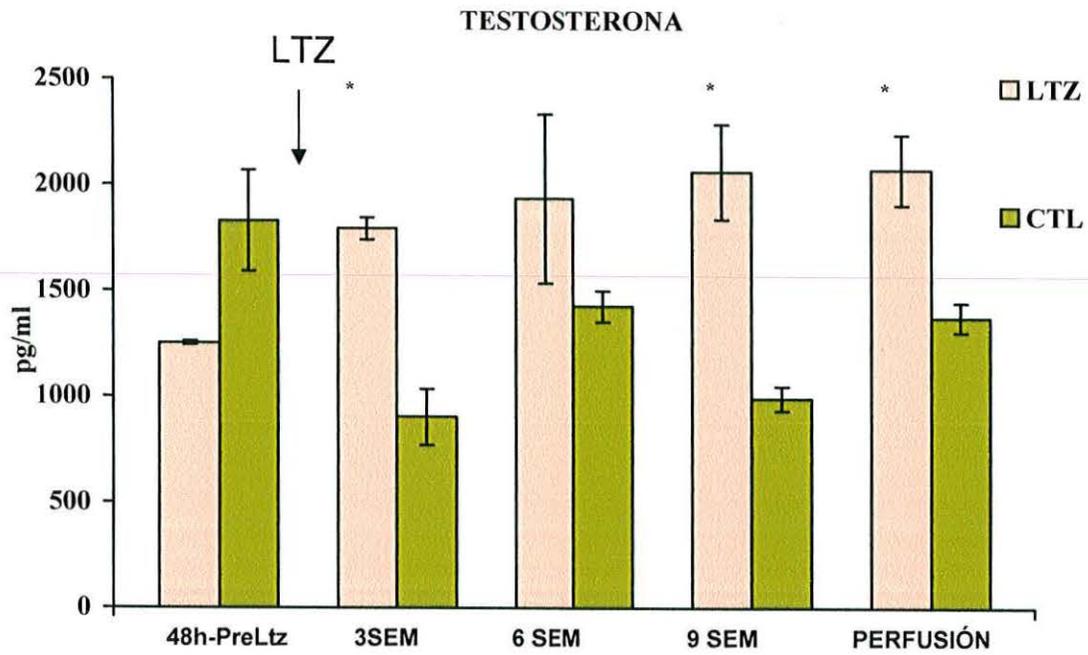


Fig 4. Niveles de Testosterona en plasma (media \pm E. S.), en los 5 periodos analizados. 48 hrs. antes del tratamiento con Letrozol, 3, 6 y 9 semanas después de iniciado dicho tratamiento, así como en el momento de perfusión. U Man Whitney entre grupos por toma.

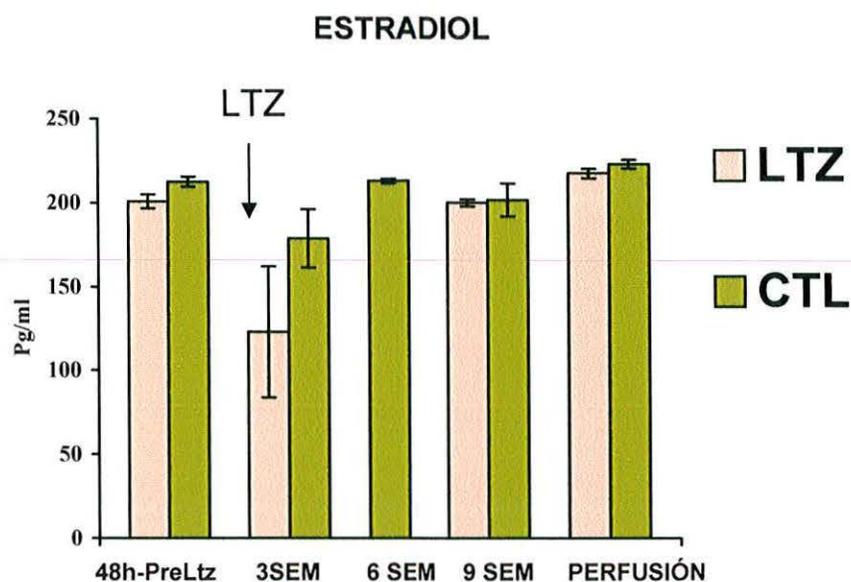


Fig 5. Niveles de estradiol en plasma (media \pm E. S.), en los 5 periodos analizados. 48 hrs. antes del tratamiento con Letrozol, 3, 6 y 9 semanas después de iniciado dicho tratamiento, así como en el momento de perfusión. U Man Whitney entre grupos por toma.

EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS SOBRE EL CICLO ESTRAL Y GÓNADAS

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 evidenciaron pautas características de esta etapa estral, por ejemplo, la conducta de lordosis. Lo anterior sugiere que la estrogenización crónica observada en nuestro trabajo experimental fue inducida por la única dosis de VE (2 mg) que administramos.

DETECCIÓN DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS

El análisis microscópico morfológico-descriptivo evidenció que los ovarios de los sujetos del grupo 2 (VE+Vh) mostraron mayor tamaño (Fig 6) (1C), menos óvulos maduros y por ende una mayor cantidad de folículos inmaduros (2C) y una mayor cantidad de quistes con la cápsula ovárica engrosada considerablemente (3C) en comparación con los ovarios de los sujetos del grupo 1 tratados con VE+LTZ (1L), (2L) y (3L) respectivamente. A continuación se muestran las correspondientes imágenes.

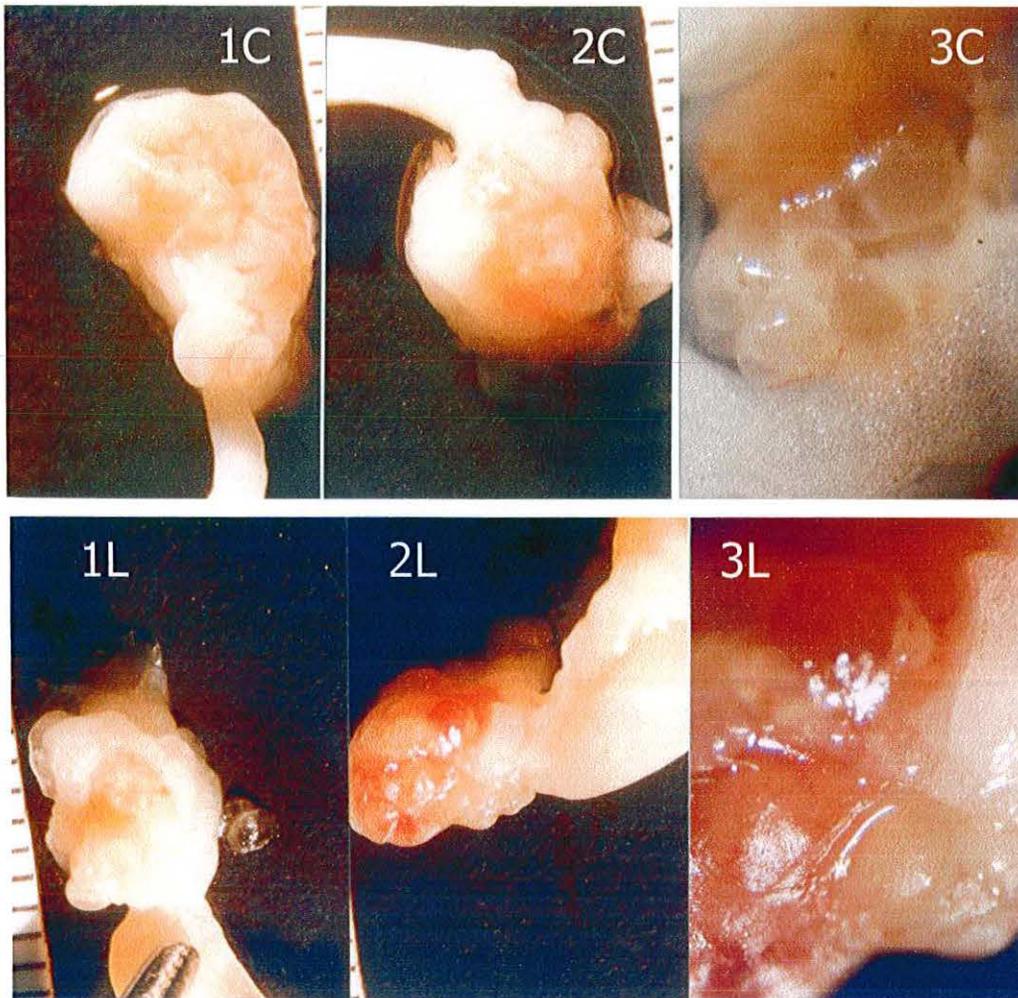


Fig 6. Lesión gonadal ocasionada por la única dosis de VE, y su menoscabo en el grupo que recibe 21 post-VE una gente que inhibe la biosíntesis de andrógenos a estrógenos por el ovario.

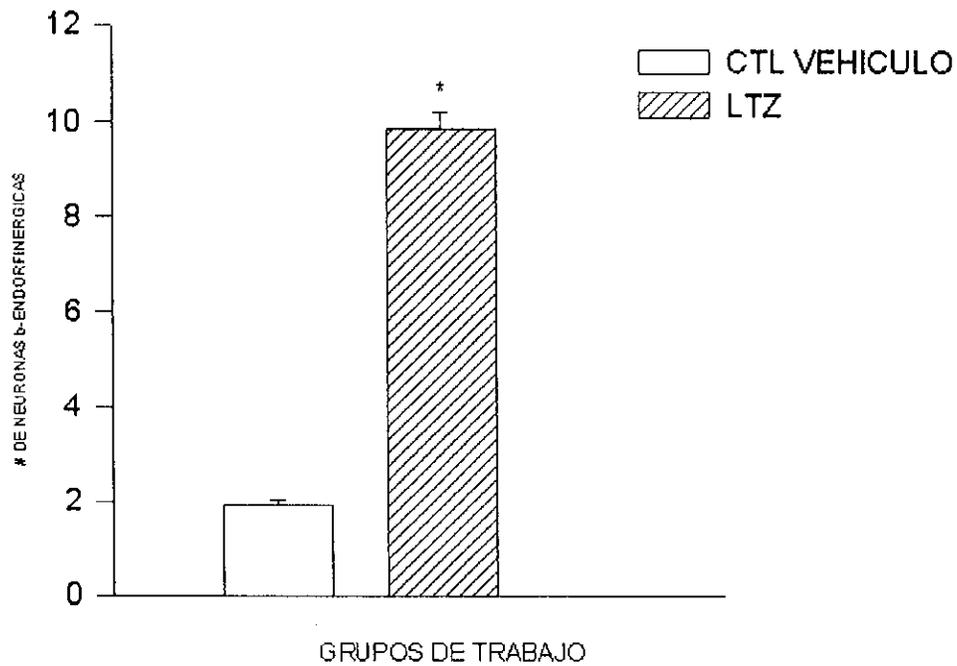
Es decir el inhibidor de aromatasa actuó favorablemente a nivel periférico ya que minimizó el daño a nivel de gónadas ejercido por el tratamiento con VE, el cual desencadenó de manera evidente ovarios poliquísticos en ratas cuyo tratamiento consistió únicamente en VE+Vh.

POBLACIÓN 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 μm 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, resultados esperados e hipotetizados en nuestro estudio, ya que el grupo que recibió el inhibidor de aromatasa, tras haberle sido administrada la dosis única de Valerato de Estradiol (2mg) mostró mayor número de neuronas β -endorfinérgicas que el grupo que recibió solamente vehículo (fig 7).

El análisis estadístico elegido para dichos datos, los cuales mostraron una distribución continua en ambos grupos, fue el análisis correspondiente a una T de student, dicho análisis es empleado y sugerido en histología general.

NEURONAS B-ENDORFINERGICAS EN EL NUCLEO ARCUATO HIPOTALAMICO



EL GRAFICO MUESTRA LA MEDIA ± E.S.

* T value: -21.4981354452 P value: 0.0000000000 Degrees of Freedom: 234

Fig 7. 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=4) 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 tanto a nivel periférico como a nivel central, al minimizar lesión a nivel de gónadas y al proteger a dichas células del núcleo arcuato hipotalámico de la citotoxicidad planteada en este modelo de estrogenización crónica.

DISCUSIÓN

El posible rol de las hormonas gonadales en el control del consumo voluntario de alcohol ha sido considerado solamente en pocos estudios. Messiha y col., (1981), reportó que la administración aguda de E2 reduce el consumo de alcohol tanto en ratas macho como en hembras que muestran alta preferencia por el alcohol. Hilakivi y col., (1996), encuentra que ratones hembras ovariectomizadas y tratadas con E2 reducen el consumo voluntario de etanol en comparación con sus controles, y deduce que el E2 decrementa la preferencia por el alcohol en ratones hembras.

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 es aún más interesante cuando atendemos al hecho de que los compuestos que inducen actividad estrogénica continua son ampliamente usados como medicamentos por las mujeres. Además es importante destacar que el apetito incrementado en la rata, inducido tras una sola dosis de VE se sostiene por varios días post-tratamiento (Marinelli y col., 2003; Reid y col., 2003; Camargo y col., 2005).

Nosotros, teniendo en cuenta que el sistema opioide endógeno, especialmente las β -endorfinas, pueden jugar un rol clave en los efectos conductuales del etanol, y considerando que una sola inyección de VE produce un efecto neurotóxico sobre neuronas β -endorfinérgicas del NAH, nos propusimos analizar el rol de los estrógenos endógenos sobre dicha neurotoxicidad. Así mismo, considerando que este tratamiento se podría emplear como modelo para medir el rol de las β -endorfinas en procesos relacionados con el abuso del alcohol o alcoholismo, realizamos el presente estudio. Las observaciones sugieren que el comienzo del estro persistente asociado con ovarios poliústicos desencadenan paralelamente una lesión histológica identificable

en el NAH, y basándonos en la especulación compartida de que el estradiol o uno de sus metabolitos están directamente relacionados con los cambios patológicos de dicho núcleo, ya que el estradiol medido en plasma es producido por los ovarios, decidimos valorar su participación directa en dicha lesión.

Nuestros hallazgos son consistentes con los de Reid y col., (2002), quienes indican que cuando el VE, es administrado después de que los consumos han sido bien establecidos (línea base), se puede observar una reducción marcada en los consumos de bebidas alcohólicas. Sin embargo, en el trabajo de Reid y col., (2002) el alcohol no se interrumpió después de la línea base en cambio en el presente estudio decidimos presentar la bebida alcohólica al tiempo en que se ha reportado que el apetito por dichas soluciones ha iniciado, dicho periodo corresponde a 4 o 5 semanas post-VE (Camargo y col., 2005), y los resultados no apoyan dicha conclusión. Los resultados del presente estudio indican que al exponer a los sujetos al consumo voluntario de etanol un mes post-VE, los consumos de la solución alcohólica se reducen paulatinamente en el curso temporal de dos meses. En cambio Reid y col., (2003) encuentran que un mes post-VE los sujetos expuestos por primera vez al consumo voluntario de bebidas alcohólicas endulzadas, en periodos de 2h/día, incrementan significativamente su consumo respecto a sus controles.

La literatura muestra que cuando las bebidas alcohólicas son presentadas continuamente en días posteriores a la iniciación de la liberación continua de E2, existe algún ajuste a la sobreestrogenización causada por el E2 y se presentan consumos incrementados de bebidas alcohólicas (Reid y col., 2002, 2003). Es posible que la adición de un endulzante a la solución alcohólica (Reid y col., 2002, 2003), lo cual es bien sabido que es un estímulo recompensante por sí mismo y que cuando es añadido a la solución, las ratas beben significativamente más líquido que el agua simple (Juárez y col., 2002). Es probable que los estrógenos pudieran haber afectado más la búsqueda del

endulzante que la búsqueda de alcohol, pero nosotros no contamos con una explicación razonable para este hecho. La importancia de una solución endulzada en el consumo de alcohol fue evidente cuando las ratas previamente tratadas con VE fueron expuestas a la solución alcohólica que inicialmente contuvo sacarina al 0.25% y después la concentración de este endulzante fue reducida gradualmente hasta 0% (Reid y col., 2003). Los resultados mostraron reducción en el consumo de alcohol en la misma manera en que el endulzante disminuyó, lo cual sugiere que el consumo de alcohol después de la administración de VE puede ser afectado por estímulos con propiedades recompensantes por sí mismos.

Observaciones previas indican que al no interrumpir los consumos de alcohol una vez administrado el VE, se observan decrementos pocos días post-VE y que al contrario, si los sujetos con corta historia de oportunidad para beber una solución alcohólica, se exponen al consumo varios días post-VE, los consumos pueden ser similares o mayores que sus controles (Reid y col., 2002). Este mismo investigador, en otro de sus experimentos, expuso a las ratas al consumo de bebidas alcohólicas endulzadas un mes post-VE, por lapsos de 2h/día y observó que los consumos se incrementaron, así mismo en una etapa posterior estos mismos sujetos fueron expuestos en sesiones diarias ilimitadas 24hrs/día, y también incrementaron sus consumos, particularmente los 3 primeros días. Aunque nuestros resultados replican en cierta manera los anteriores, en cuanto a que nuestros sujetos bebieron considerablemente cantidades mayores los primeros tres días del período de re-exposición al etanol, al inicio de la quinta semana post-VE, nosotros razonamos que es un simple efecto de privación al etanol descrito en varios estudios y no un incremento atribuible al efecto del VE en sí.

Marinelli y Gianoulakis (2003), expusieron tres meses post-VE al consumo voluntario de etanol a las ratas, y encontraron que los consumos se incrementaron significativamente, así mismo ocurrió con otro grupo el cual 2

meses post-VE fue expuesto al consumo voluntario de etanol, esta última metodología no concuerda con el hallazgo de Reid (2002) ya que en uno de sus experimentos, ratas tratadas con VE y cuya exposición al consumo ocurrió 2 meses después, no incrementaron sus consumos. Además tampoco estos dos hallazgos son consistentes con los nuestros ya que en el curso temporal de dos meses de post-tratamiento con etanol, no se detectaron incrementos sobre dicha variable.

El incremento esperado en consumo de etanol pudo no haberse desarrollado en nuestras ratas debido a que tal vez desarrollaron una aversión condicionada hacia la bebida alcohólica, vía las inyecciones diarias subcutáneas del inhibidor de aromatasa o su vehículo. Consideramos realmente como una variable importante esta manipulación post-VE ya que ningún otro estudio somete a este tipo de variables a los sujetos una vez aplicada la dosis crónica de estradiol. Así mismo nos atrevemos a inferir que el dolor provocado por la viscosidad del vehículo inyectado, pudo estar provocando en las hembras la liberación de β -endorfinas, como respuesta biológica analgésica normal, volviéndolas de esta manera menos susceptibles a la necesidad de ingerir la solución alcohólica para liberar dicho péptido.

A pesar de que Reid y col., (2002) señalan 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 datos 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

sumamente diferente el presentar de manera limitada una bebida alcohólica, a presentarla ilimitadamente.

A pesar de los datos arrojados por experimentos recientes (Ford y col., 2001; Marinelli y col., 2000, Reid y col., 2002) y aún datos de nuestro laboratorio (Camargo y col., 2005), en los cuales se sostiene que los cambios inherentes a dosis farmacológicas de E2 pueden inducir un gran apetito por bebidas alcohólicas, nosotros encontramos que tras el periodo de abstinencia de 4 semanas, los sujetos bebieron bastante en los 3 primeros días, y entonces se podría deducir que la abstinencia provoca una motivación incrementada para tomar bebidas alcohólicas. Sin embargo, los consumos no se mantuvieron, sugiriendo la posibilidad de que las ratas tomaron cantidades similares a la LB, pero presentaron pérdida en alguna habilidad para metabolizar rápidamente el etanol, y bebieron cantidades suficientes de etanol para inducir un estado de malestar que, en turno, podría provocar alguna moderación de consumo en los días subsecuentes. Nosotros asumimos que los efectos post-ingesta del alcohol son realmente complejos. Un efecto post-ingesta de consumos diarios de alcohol es un cambio en las propiedades hedónicas del alcohol, manifestándose en reacción a su gusto por la bebida.

La ingesta de etanol en ratas tratadas con VE no mostró cambios significativos a lo largo del post-tratamiento en ninguno de los 2 grupos, es decir, ni el VE, ni el tratamiento con el inhibidor de aromataasa (LTAZ) modifican o afectan a dicha variable. Este hallazgo es un indicativo de que la inhibición estrogénica a ratas con ovarios intactos previamente tratadas con VE, no incrementa el consumo por la bebida alcohólica en el periodo en el cual se ha descrito que el apetito por dicha preparación se ve incrementado por la sola inyección de VE (Reid y col., 2003; Camargo y col., 2005).

Dado que la lesión en neuronas β -endorfinérgicas del núcleo arcuato hipotalámico, no ocurre en ratas ovariectomizadas previamente al tratamiento de VE (Brawer y col., 1980), se especula que la patología evoluciona en respuesta a una exposición ininterrumpida a concentraciones 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.

Reid y col., (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 y col., 1978 y 1980).

Marinelli y col., (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 y col., 2002; Camargo y col., 2005) ni tampoco solo después de 15 días (Reid 2003) es posible desencadenar el efecto sobre la ingesta de bebidas alcohólicas. Los datos anteriormente mencionados, indican que la lesión es permanente sobre dichas células y no un efecto transitorio.

La pregunta por resolver es evidentemente ¿porqué ocurren estas discrepancias entre los resultados de las diversas investigaciones que emplean este modelo, para estudiar los efectos sobre el consumo del alcohol? y creemos que es necesario considerar las diferencias metodológicas sobresalientes entre los estudios comentados y el nuestro, que consisten en la presencia o ausencia de un endulzante a la bebida alcohólica, el periodo abstinerente post-VE, la exposición limitada a 2 hrs/día, 3 veces por semana a diferencia de 24 hrs/día 7 veces por semana, así como la aplicación de el inhibidor de la biosíntesis estrogénica vía s.c. en un vehículo considerado doloroso dada su viscosidad. Creemos que la exposición voluntaria al alcohol sin endulzante aporta datos mayormente confiables, así mismo, empleamos ratas estándar de laboratorio, las cuales no fueron seleccionadas genéticamente por su preferencia al alcohol, por lo tanto no es sorprendente encontrar reducciones en los consumos de etanol tras varias manipulaciones experimentales.

Dado que en el estudio de Camargo y col., (2005) el efecto mostrado sobre el incremento en el consumo del etanol, en las semanas 4 y 5 post-VE, no se mantiene, se podría especular 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. Así mismo el hecho de que en dicho estudio no se encontraron diferencias en los niveles de β -endorfinas al final, apoya esta hipótesis, misma que ha sido previamente sustentada (Marinelli y col., 2003).

Al parecer la exposición al estradiol provoca una aversión inicial seguida por una preferencia gradualmente desarrollada por el alcohol. Sin embargo el actual estudio revela que el VE no ejerció ningún efecto sobre el consumo del alcohol. Y consideramos la posibilidad de que el VE podría causar déficits en las propiedades recompensantes del alcohol a través de la depleción de β -

endorfinas hipotalámicas (Desjardins y col., 1990; 1992). O bien que al presentar niveles elevados de estrógenos en plasma, estos sujetos mantuvieron un estado subjetivo de bienestar al cual respondieron con la no necesidad de beber altas cantidades de la solución alcohólica, concordando con el hecho ampliamente descrito de que mujeres con bajos niveles de estrógenos favorecen su estado anímico bebiendo alcohol, el cual facilita la liberación de estos esteroides.

Nosotros medimos niveles de estradiol plasmático, y consideramos que esto añade valor considerable al estudio. Sin embargo al no haber encontrado una cuantificación significativamente menor en el grupo VE+LTZ, hace pensar que la inhibición de la enzima que cataliza la biosíntesis de andrógenos a estrógenos no ejerció el efecto necesario para alterar esta variable periférica. Este hallazgo concuerda con estudios previos que emplean este tipo de inhibidores con el fin de determinar los efectos de una administración crónica de un inhibidor de aromatasa no esteroide en ratas macho adultos, sobre la función hipofisiaria, testicular y fertilidad (K. J. Turner y col., 200) los cuales tampoco encuentran reducciones significativas en E2 tras la manipulación experimental. Por su parte, el inhibidor de aromatasa no esteroide elegido, incrementó significativamente los niveles de Testosterona congruentemente con lo esperado

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. Dado que el VE tiende a desaparecer del organismo, a los 20 días, y al encontrar niveles plasmáticos significativamente elevados, meses post-VE, indica que los niveles encontrados son producidos por los ovarios. Los ovarios poliquísticos inducidos con VE podrían reflejar una sobrerregulación de receptores opioides μ en GnRH volviéndolas crónicamente susceptibles a inhibición opioide. Es de

particular interés que el sistema opioide hipotalámico parece jugar un rol clave en la patología de ovarios poliquísticos.

Justo después de la inyección de VE, se detectó una pausa en la ganancia de peso a lo largo de la primera semana post-VE, coincidiendo con reportes previos (Reid y col., 2002). Dicha 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. La pérdida de peso inicial, puede indicar indisposición debido a la variedad de disturbios potenciales en la homeostasis ya que por lo general 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, siendo más evidente en aquel que conformó al grupo VE+Vh, y aunque desconocemos la causa de este efecto, parece estar asociada a la manipulación durante el periodo de inyecciones y a la posibilidad de que compensaban su ingestión de líquidos, bebiendo mayores cantidades de agua que de la solución alcohólica, por ende el agua fue a lo largo del post-tratamiento con alcohol, el líquido de mayor preferencia.

Nosotros consideramos que el VE indujo degeneración del sistema de β -endorfinas, y consecuentemente redujo los inputs de β -endorfinas hacia el APM, provocando una sobrerregulación de receptores opioides μ en dicha área, volviendo a las células GnRH supersensibles a la acción inhibitoria de opioides endógenos residuales (Desjardins y col., 1990, Carriere P. D. y col., 1989). Así, la persistente inhibición resultante de la liberación de GnRH pudo desencadenar el patrón de liberación LH crónicamente suprimido, hacia el cual los ovarios respondieron volviéndose poliquísticos. Nosotros opinamos que el decremento en neuronas β -endorfinérgicas, observado en nuestro estudio

aunado al desarrollo de ovarios poliquísticos, indican que el efecto inducido por el VE es de significación clínica.

La presente investigación sustenta el que una sola inyección de VE dada a ratas hembras adultas que ciclan normalmente, provoca anovulación crónica, cornificación vaginal persistente y ovarios poliquísticos. 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.

Sin embargo se debe ejercer cierta precaución en la interpretación de estos resultados y se necesitan más estudios con el propósito de elucidar el rol de los estrógenos endógenos sobre la citotoxicidad en neuronas POMC del NAH. Además dado que hay una diferencia significativa entre el número de neuronas β -endorfinérgicas de nuestro grupo VE+LTZ y un grupo control de Camargo y col., (2005), siendo mayor en este último, encontramos necesaria la realización de más estudios que exploren el mecanismo preciso a través del cual, en estas condiciones experimentales, se produce la depleción selectiva de dichas células.

CONCLUSIONES:

□ El VE:

- Decrementó el consumo de alimento (en ambos grupos, significativamente en la primera semana).
- Provocó estro continuo en las hembras, así como pautas conductuales características de dicha etapa del ciclo estral.
- Desencadenó ovarios poliquísticos en los sujetos.
- La ausencia de efecto del VE sobre el consumo del alcohol, no concuerda con el estudio previo llevado a cabo en nuestro laboratorio, lo cual puede deberse a diferencias metodológicas.
- Decrementó de forma drástica el número de neuronas β -endorfinérgicas en el núcleo arcuato hipotalámico, en el grupo control, el cual solo recibió vehículo tras su aplicación.

□ El tratamiento con Letrozol:

- No produjo efecto significativo sobre el consumo de alimento y peso.
- Incrementó los niveles plasmáticos de Testosterona y se observó ausencia de diferencias en Estradiol, coincidiendo con hallazgos previos al emplear dicho fármaco.
- 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.
 - Redujo el daño ocasionado sobre las gónadas.
- Nuestros hallazgos concuerdan con nuestras hipótesis ya que el inhibidor de la biosíntesis estrogénica elegido para los presentes fines, ejerció el efecto esperado al proteger a la población de neuronas β -endorfinérgicas, indicando que efectivamente los estrógenos endógenos son responsables de la citotoxicidad; sin embargo, juzgamos necesaria la realización de nuevos estudios en los cuales se empleen dosis mayores de este agente, pues comparando resultados, en el estudio previo de nuestro laboratorio, un grupo control que recibe el vehículo correspondiente al VE, muestra un número significativamente mayor de neuronas β -endorfinérgicas que nuestro grupo 1 (VE+LTZ).

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.

Almeida OFX., Shoaib M., Deicke J., Fischer D. (1998); Gender differences in ethanol preference and ingestión in rats. The role of gonadal steroid environment. *J Clin Invest*, 101, 2677-85.

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 aromatasa inhibitors. *Clin Cancer Res* 9: 468 S-72S.

Camargo y col., (2005); Efecto de una dosis de Valerato de Estradiol en el consumo de Alcohol y en la población de neuronas secretoras de beta-endorfinas en el núcleo arcuato hipotalámico. Instituto de neurociencias, Universidad de Guadalajara, Gdl. Jal. Méx.

Carriere P. D., Farookhi R., Brawer J. R., (1989); The role of aberrant hypothalamic opiateergic 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.

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.

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 prefering 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.

Emanuele N. Emanuele, M.A., (1997); The endocrine system, Alcohol alters critical hormonal balance. *Alcohol Health and Research World*, 21, 53-64.

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 en normal postmenopausal women: Relationship to the literature. *Alcoholism: Clin Exp Res.* 16, 87-92.

Genazzani A. R., Nappi G., Facchinetti F., Mazzella G. L., Parrini D., Sinforiani E., Petraglia F., y Savoldi F., (1982); Central deficiency of beta-endorphin in alcohol addicts. *Endocrinology*, 55, 583-586.

Gianoulakis, Christina., (2004); Endogenous Opioids and Addiction to Alcohol and other Drugs of Abuse. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Volume 4, Number 1, pp. 39-50(12); Bentham Science Publishers.

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.

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

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.

Herz, A., (1997); Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psichofarmacology*, 129, 99-11.

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.toac-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, Barrios E. Virgen M., (2002); Effects of estradiol treatment on voluntary and forced alcohol consumption in male rats. *Pharmacol. Bioch. Behavior*, 71, 259-268.

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.

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.

K. J. Turner, M. Morley, N. Atannasova, I. D. Swanston y R. M. Sharpe, (2000): Effect of chronic administration of an aromatasa inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. *Journal of Endocrinology* 164, 225-238.

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.

Koob, G., (1996); The neurobiology of ethanol-opioid interactions in ethanol reinforcement. *Alcoholism, Clin Exp Res*, 20, 182A-186A.

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.

LapchaK, P. A., (1991); Effect of estradiol treatment on beta-endorphin content and release in the female rat hypothalamus. *Brain Res*, 554, 198-202.

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.

Marinelli, P. W., Kiiianmaa 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.

Ř. Eshet, G Maor, T Ben Ari, M Ben Eliezer, G Gat-Yablonski, and M Philip., (2004); The aromatasa 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 naloxona 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., Fiscala, 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.

Ruusa J., Bergman B., Sundell M. L., (1997); Sex hormones during withdrawal: a longitudinal study of 29 male alcoholics during detoxification. *Alcohol Alcohol.* Sep-Oct; 32 (5): 591-7.

Sandberg, D., David S., Steward, J., (1982); Effects of estradiol benzoate on the pattern of eating and ethanol consumption. *Physiol. Behav.* 29 (1): 61-65.

Sandberg D., Steward, J., (1982); Effects of estradiol benzoate and Mer-25 on ethanol consumption in the ovariectomized rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96 (4): 635-648.

.

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., Desjardins G. C., Beaudet A., Brawer J. R., (1994); The 21-aminoesteroid antioxidant, U74389F, prevents estradiol-induced depletion of hypothalamic beta-endorphin in adult female rats. *Brain Res.* Jul 25; 652(1):161-3.

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-Cantuniaru 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.

Sinchak K., Micevych P., (2003); Visualizing activation of opioide circuits by internalization og G protein-coupled receptors. Mol neurobiol, 27 (2): 197-222.

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.

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.

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

Teschke, R., Heymann, K., (1982); effect of sex hormones on the activities of hepatic alcohol metabolizing enzymes in male rats. Enzyme. 28 (4): 268-277.

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.

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.

Villalta J., Balleca J. L., Nicolas J. M., Martinez de Osaba M. J., Antunez E., Pimentel C., (1997); Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. Alcohol Clin Exp Res. 1997 Feb;21(1):128-33.

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.