

ARTICULO N° 3

EFECTO ANSIOLÍTICO DE ALLOPREGNANOLONA INTRACEREBRAL EN RATAS SPRAGUE DAWLEY. LABINCIMED FEBRERO - ABRIL 2017

ANSIOLYTIC EFFECT OF ALLOPREGNANOLONE INTRACEREBRAL IN
SPRAGUE DAWLEY RATS. LABINCIMED. FEBRUARY - APRIL 2017

3

Autores:

¹Molina Frías Nilson César,

¹Flores Maita Andrea Victoria,

¹Aguirre Bejarano Marlen Everlyn,

²Lorena Camargo Arce

Correo electrónico: lorenacamargo22@gmail.com

RESUMEN

Allopregnanolona se produce en el cerebro y las glándulas suprarrenales. La progesterona y sus metabolitos, entre estos allopregnanolona pueden inducir acciones ansiolíticas mediadas por la activación del complejo receptor GABA_A, un efecto similar al producido por los ansiolíticos.

El propósito de este estudio fue determinar el efecto ansiolítico de allopregnanolona en ratas adultas macho que tienen pocos receptores para este metabolito.

Se realizó investigación experimental básica, diseño aleatorio, doble ciego, comparación de medias, en LABINCIMED-UAJMS, Tarija, febrero-abril 2017. Se utilizaron 24 ratas Sprague Dawley machos, criadas en condiciones estándar,

de 3 meses de edad, 4 grupos para estudio con n=6: un control; canuladas en tercer ventrículo; canuladas y estresadas; canuladas estresadas y con Allo. Por cirugía estereotáxica se implantó una cánula en tercer ventrículo y se administró allopregnanolona media hora antes del test Plus Maze Elevated, valorándose el tiempo de exploración en brazos abiertos y cerrados.

Los resultados mostraron que el grupo que recibió tratamiento con inyección de 1 µl allopregnanolona IV antes de someterse al procedimiento estresor registró una mayor exploración y permanencia en el brazo abierto, siendo la diferencia muy significativa (p < 0,01) entre los grupos y comprobándose en el test de Tukey la diferencia con p < 0,05 entre el grupo canulado que no recibió Allo y el que recibió Allo, con lo que se confirma el efecto ansiolítico potente del tratamiento.

¹ Investigador Junior del Laboratorio de Investigación en Ciencias Médicas, Facultad de Medicina, UAJMS

² Directora e Investigadora del Laboratorio de Investigación de Investigación en Ciencias Médicas, Docente Titular de la Facultad de Medicina, UAJMS Tarija - Bolivia

Palabras claves

Allopregnanolona, ansiolítico, cirugía estereotáxica

ABSTRACT

Allopregnanolone is produced in the brain and adrenal glands. Progesterone and its metabolites, among these allopregnanolone, can induce anxiolytic actions mediated by the activation of the GABA_A receptor complex, an effect similar to that produced by anxiolytics.

The purpose of this study was to determine the anxiolytic effect of allopregnanolone in adult male rats that have few receptors for this metabolite.

Basic experimental research, randomized design, double-blind, comparison of means, was carried out in LABINCIMED-UAJMS, Tarija, February-April 2017. Twenty 24 male Sprague Dawley rats, reared under standard conditions, 3 months of age, 4 groups were studied for = 6: a control; cannulated in third ventricle; cannulated and stressed; cannulated stressed and with Allo. For stereotactic surgery, a cannula was implanted in the third ventricle and allopregnanolone was administered half an hour before the Plus Maze Elevated test, assessing the exploration time in open and closed arms. The results showed that the group that received treatment with injection of 1 µl allopregnanolone IV before undergoing the stressor procedure recorded a greater exploration and permanence in the open arm, being the difference very significant ($p < 0.01$) between the groups and verifying in the Tukey test, the difference with $p < 0.05$ between the cannulated group that did not receive Allo and the one that received Allo, confirming the powerful anxiolytic effect of the treatment.

Keywords: Allopregnanolone, anxiolytic, stereotactic surgery

INTRODUCCIÓN

Los neuroesteroides son una subclase de esteroides que pueden ser sintetizados en el sistema nervioso central de novo a partir del colesterol independientemente de las fuentes periféricas. El término esteroide neuroactivo, que se utiliza regularmente en un sentido más general, se refiere a esteroides que independientemente de su origen, son capaces de modificar actividades neurales y fue propuesto para todos los esteroides naturales o sintéticos que pudieran alterar de forma rápida la excitabilidad neuronal mediante su unión a receptores de membrana de la misma manera que actúan los neurotransmisores (Pallarès AM, 2007).

El esteroide allopregnanolona (Allo) es sintetizado de novo en el sistema nervioso central en el embrión y en el adulto. Su tasa de producción y los niveles en suero y las glándulas suprarrenales disminuyen gradualmente con la edad avanzada. Allo incrementa significativamente la proliferación de las células progenitoras in vitro vía receptor GABA_A y mecanismos calcio dependientes (Wang JM, 2010).

Los niveles circulantes de NE disminuyen marcadamente con la edad, alcanzando a los 80 años niveles que equivalen al 20% de los observados a los 20 años de edad. La fluctuación de los niveles corticales de Allo a lo largo de la vida puede constituir un importante factor relacionado con el estrés, la memoria, la ansiedad o la conducta sexual, aspectos que están típicamente alterados en edades avanzadas y que se pueden relacionar con la variedad de trastornos afectivos observados en la vejez (Pallarès AM, 2007).

Allo promueve la neurogénesis en el modelo de ratón y la supervivencia de las nuevas células neurales generadas, estos hallazgos proporcionan evidencia preclínica para el régimen de tratamiento óptimo con Allo para lograr la eficacia como una modificación de la enfermedad tera-

péutica para promover la regeneración al tiempo que disminuye la patología asociada con las enfermedades neurodegenerativas (Chen Sh, 2011).

La Allo sirve como prueba de concepto para terapias que apuntan a la regeneración endógena, ventanas de oportunidad terapéutica para la regeneración y factores críticos de la biología del sistema que determinarán la eficacia de la regeneración (Brinton RD, 2013).

La Allo es un agente neurotrófico potencial. La pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra es una de las principales características patológicas del Parkinson y también, al menos, de un subconjunto de pacientes con Alzheimer, por lo tanto, la reinstalación de las neuronas de dopamina en el tracto nigrostriatal es de una importancia única para estas enfermedades neurodegenerativas (Wang JM, 2014).

Las neuronas y las células de la glia están equipadas para la producción de novo de hormonas esteroideas, denominados neuroesteroides. Esto es región específica (córtex e hipocampo) e independiente de la secreción periférica. También incluye a los metabolitos de hormonas esteroideas periféricas localmente convertidos en el sistema nervioso central (Wang JM, 2010). Entre los más extensamente estudiados se encuentran: la Allo, alotetrahydrodeoxicorticosterona y androstanediol, que actúan a través del receptor GABA_A (pentámero que conforma un canal de cloruro) a través de unión a sitios específicos, en el dominio transmembrana de las subunidades α y β , diferentes al sitio de unión de las benzodiazepinas, barbitúricos y del GABA. Su activación conduce a la afluencia de iones de cloruro y a una hiperpolarización de la membrana, reduciendo la excitabilidad neuronal (Haseitel M, 2015).

Ciertos neuroesteroides, y en particular los derivados 3 α de la progesterona, se comportan como moduladores alostéricos positivos de los

receptores GABA_A. El receptor se ubica en la membrana de las neuronas y generalmente se localiza en la sinapsis de modo post-sináptico (Martín-García E, 2007).

GABA_A es el principal inhibidor de la neurotransmisión en el sistema nervioso central. Este receptor controla un canal de cloro (Cl⁻) y su excitación produce la entrada de iones Cl⁻, aumentando la concentración de cargas negativas al interior de la membrana, lo que lleva a su hiperpolarización y hace menos probable la propagación del potencial de acción. Esto revierte el potencial de membrana y estabiliza el potencial de reposo de la célula, dificultando que los neurotransmisores excitatorios puedan repolarizar la célula y generar un potencial de acción (Pallarès AM, 2007).

Parece ser que Allo tiene dos efectos, uno en el sistema límbico donde ayuda a calmarse al individuo, y otro en hipocampo donde, en el caso de los adolescentes, los excita (Riveros-Barrera I, 2014).

La progesterona y sus metabolitos reducidos se comportan como agonistas alostéricos del complejo receptor GABA_A/benzodiazepina, en el que aumentan la frecuencia de apertura del canal del flujo iónico. Como contraparte, los receptores GABA_A constituyen un sitio de reconocimiento de diversos compuestos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivantes. En efecto, la progesterona y sus metabolitos pueden inducir acciones ansiolíticas y antidepressivas mediadas por la activación del complejo receptor GABA_A, un efecto similar al producido por la mayoría de los fármacos ansiolíticos conocidos (9 Riveros-Barrera I, 2014). Asimismo, la administración exógena de progesterona reduce los niveles evaluados de ansiedad en las pruebas conductuales de conflicto. La progesterona y otras progestinas inducen la anestesia, la analgesia y la hipnosis por su alta afinidad con el complejo receptor GABA_A, y por potenciar la conductancia iónica de cloro de manera similar a la de los barbitúricos y las benzodiazepinas. Estas hormonas modifican la excitabilidad de grandes poblaciones neuronales que desempeñan un papel im-

portante en la epilepsia (Riveros-Barrera I, 2014)

Los estados de ansiedad, depresión y situaciones de estrés tienen en común la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, lo cual se relaciona con el incremento sérico de esteroides, y en forma alterna con el incremento de esteroidogénesis glial. La depresión y la ansiedad están relacionadas con la actividad GABAérgica de acuerdo con los siguientes datos: a) los niveles de GABA en líquido cerebrospinal se encuentran disminuidos en pacientes con diagnóstico de depresión; b) GABA-agonistas disminuyen la ansiedad; c) la inyección de bicuculina (GABA-antagonista) disminuye la conducta depresiva; d) los antidepresivos tricíclicos inhiben la recaptura de GABA y estimulan su liberación; e) los efectos GABA, agonistas incrementan la actividad adrenérgica. Los niveles plasmáticos y cerebrales de algunos esteroides adrenales y neuroesteroides tienen un ciclo diurno. En el cerebro de rata, la progesterona sulfato y la dehidroepiandrosterona sulfato se incrementan en las primeras horas de la noche y disminuyen en las primeras horas del día (Riveros-Barrera I, 2014). En los experimentos en animales de laboratorio se ha observado el efecto ansiolítico de la progesterona, que se atribuye, principalmente, a su metabolito reducido, la Allo (Riveros-Barrera I, 2014).

Ontogenéticamente, existen cambios en la producción de los neuroesteroides a diferentes edades: la progesterona y progesterona sulfato disminuyen cerca de un 60% en sus niveles en el sistema nervioso central a los 70 años, comparando con los niveles de la cuarta década de la vida; algo semejante sucede con la dehidroepiandrosterona, la cual gradualmente reduce sus niveles plasmáticos y en el sistema nervioso central conforme avanza la edad, considerándose por algunos como un elixir de la juventud; pues en ancianos, la dehidroepiandrosterona, mejora procesos amnésicos, físicos e inmunes; sin embargo, estos datos requieren ser confirmados (Riveros-Barrera I, 2014).

El estrés o miedo es una emoción que sirve para la expresión de comportamientos defensivos en situaciones de peligro. Posee un sustrato biológico, con base en el funcionamiento coordinado de los diferentes sistemas orgánicos.

Particularmente, el sistema nervioso en su actividad intrínseca genera la vivencia y la acción motriz derivada. Se ha hallado la intervención de varias estructuras neuroanatómicas como la amígdala e hipotálamo, así como un gran conjunto de moléculas distintas como neurotransmisores y sus receptores. La interacción anatómofuncional causa la emoción. Al igual que se cuenta con la capacidad de producir el estrés, también se puede regular su generación. Para este mecanismo se encuentran determinadas estructuras neuroanatómicas como la corteza prefrontal y orbitofrontal, y sustancias como el GABA y los opiáceos, que inhiben o reducen la actividad en las zonas activas que actúan en el miedo. El equilibrio entre la activación y la inhibición posibilita la ocurrencia del estrés en las circunstancias requeridas y no de una manera descontextualizada o generalizada (Sánchez-Ramírez JD, 2009).

La regulación del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal juega un papel importante en permitir que los animales respondan a los desafíos de estrés y los superen. Los glucocorticoides, las principales hormonas efectoras del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal, funcionan para preparar al organismo para abordar situaciones estresantes y proporcionar la retroalimentación negativa necesaria para suprimir la actividad del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal para facilitar la recuperación y un retorno a la línea de base. La retroalimentación negativa de los glucocorticoides se realiza en diferentes marcos de tiempo y por diferentes mecanismos moleculares. Generalmente se cree que la retroalimentación rápida de glucocorticoides (30 min) se produce mediante acciones no fenoménicas, mientras que la retroalimentación negativa a medio y largo plazo (30 min a horas a días) se produce mediante la activación / desactivación transcripcional y la regulación de la síntesis de proteínas (Franco AJ, 2016).

La síntesis de estrógenos después de una le-

sión cerebral penetrante es una señal antiinflamatoria potente e inducible, con modulación específica de la señalización discreta de citoquinas (Pedersen AL, 2016).

Las hormonas esteroideas sexuales, entre éstas la allopregnanolona, tienen mecanismos de acción y efectos similares en animales y humanos, debido a que se comparten aspectos neurobioquímicos entre todas las especies del reino animal, a ello se debe la posibilidad de extrapolar los resultados encontrados en experimentos animales para uso en tratamientos de humanos.

El presente estudio en ratas corresponde a la fase I de investigación experimental; se plantea comprobar el efecto ansiolítico de Allo administrada intracerebralmente en tercer ventrículo a ratas Sprague Dawley adultas, cuyos resultados se espera contribuyan a investigaciones experimentales de fase II en humanos, con la aplicación clínica de allopregnanolona, a pacientes varones con cuadros de estrés y ansiedad generalizada y mujeres en el climaterio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: investigación experimental básica, diseño aleatorio, doble ciego, comparación de medias.

Espacio y tiempo: el trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Médicas de la Facultad de Medicina de la UAJMS (LABINCIMED-UAJMS), febrero a abril de 2017.

Universo: ratas albinas criadas en el bioterio del LABINCIMED-UAJMS.

Muestra: 24 ratas albinas machos, de la cepa Sprague Dawley, de 3 meses de edad, estabuladas con ciclos luz/oscuridad de 12 horas (Padhy G, 2013), temperatura 20-22° C, agua y alimento ad libitum (Mittelman-Smith MA, 2016). Los animales fueron mantenidos en cajas plásticas traslúcidas (León R, 2015) y colo-

cados 4 por caja (Serebrovskaya TV, 2013).

Grupos de estudio: con n=6 (Li X, 2014), debido a que la cepa Sprague Dawley es una cepa consanguínea, genéticamente homogénea, con poca variabilidad.

1. Grupo control: ratas no operadas no estresadas no recibieron Allo
2. Grupo operadas: ratas operadas no estresadas no recibieron Allo
3. Grupo operadas: ratas operadas estresadas no recibieron Allo
4. Grupo operadas: ratas operadas estresadas recibieron Allo

Duración: el experimento tuvo una duración de 18 días.

Definición operacional de variables:

1. Administración de Allopregnanolona a grupos experimentales con una dosis de 1 µl vía cánula intracerebral ubicada en tercer ventrículo
2. Inducción de estrés a grupos experimentales y a un grupo control a través de inmovilidad durante 30 minutos
3. Valoración del efecto ansiolítico del inductor del estrés y el efecto ansiolítico de Allo a través del test Elevated Plus Maze

PROCEDIMIENTOS

Los procedimientos que se emplearon fueron:

Canulación por estereotaxia de tercer ventrículo. Coordenadas: El 3° ventrículo se encuentra a una distancia aproximada de 9.5 mm hacia abajo desde el cráneo en el punto guía 0 (bregma), por lo tanto la cánula es colocada en línea recta sobre el 3° ventrículo, hasta quedar a 4 mm de distancia del mismo. Las cánulas son colocadas con la finalidad de servir como guía para la posterior inyección intraventricular (IV) de allo el día correspondiente a la aplicación del test de evaluación de la memoria. Se

utiliza cánula de 13 mm de largo, se sujeta al estereotáxico y se baja una distancia de 5.5 mm. Posteriormente se utiliza una cánula de inyección de 17,5 mm de largo, guiada por la cánula previamente colocada, llegando al centro del 3° ventrículo.

Procedimiento:

1. Se procede a pesar a la rata, luego fue anestesiada con Hidrato de cloral al 8% a razón de 0.5 ml/100 gramos peso. Posteriormente fue colocada en el estereotáxico marca Ugo Basile. Para 3° ventrículo el estereotáxico debe estar en una angulación de 5 grados.
2. Se inyecta una dosis de 50.000 UI de penicilina (Para penicilinas de 3.000.000 UI se diluye con 6 ml de agua destilada y se inyecta 0,1 ml de esta solución) vía IM.
3. Se afeita la parte superior de la cabeza y previa antisepsia con povidine iodado se procede a realizar la incisión. Se retira tejido conectivo y periostio y procede a marcar el lugar donde insertar la cánula visualizando al bregma. Con un torno manual se realizaron los orificios correspondientes tanto para la cánula como para el tornillo que ayuda a mantenerla en su lugar
4. Se coloca el tornillo, luego la cánula hasta la profundidad indicada y procede a fijar todo con polímero acrílico autocurable; una vez secado se retiró la guía del estereotáxico. Se colocan puntos a la incisión y se desinfecta nuevamente. Se deja un mandril en la cánula para evitar que esta se obstruya con diferentes secreciones procedentes del cerebro.
5. Se retira al animal del aparato y posteriormente fue colocado en una caja individual debajo de una lámpara de calor hasta su recuperación. Se prepara una solución analgésica con paracetamol líquido y agua, dejándose a disponibilidad del animal para beber e libre demanda.

Inducción de estrés

El estrés se induce mediante la restricción de movimientos. De acuerdo con el ciclo circadiano de secreción de corticosterona, la inducción

de estrés de cada animal se programa de modo tal que empieza después de las 7:00 a.m. y finaliza antes de las 11:30 a.m. Para ello, en una cabina separada de la sala experimental y el bio-terio, cada animal se introduce suavemente en un cilindro de PVC (base: 6 cm, altura: 20 cm), cuyas bases se cierran con tapas perforadas. Dentro de este cilindro el animal puede respirar y mover sus extremidades, pero no puede girar sobre su eje dorsoventral. Cada animal permanece durante un período de una hora dentro del cilindro con su eje mayor dispuesto horizontalmente (Troncoso J, 2010).

Administración de Allo:

Se realiza la administración a través de la cánula con jeringa Hamilton de 10 µl: administrando 1 µl media hora antes de someter a restricción de movimiento durante el 5° día y hora y media antes de realizar el test Elevated Plus Maze.

❖ **Test Plus Maze Elevated:** se realiza después de la inducción del estrés en los grupos experimentales. Se coloca al animal en el extremo de un brazo abierto y se le deja explorar libremente durante 120 segundos, se procede a filmar para luego tabular los datos obtenidos. Si el animal se cae en los brazos abiertos se vuelve a colocarlo sobre el brazo. Se registra el número de entradas a los brazos cerrados y el tiempo de permanencia en los brazos cerrados en cada entrada, se suma el total que expresa la tendencia del animal a esconderse por haber desarrollado ansiedad o estrés.

Extracción de cerebro: A la conclusión de la prueba Laberinto en Cruz las ratas fueron decapitadas con una guillotina pequeña para roedores (Franco AJ, 2016), previa anestesia con hidrato de cloral al 8%, el cerebro fue rápidamente extraído y colocado en formol al 10% durante una semana.

Procesado histológico:

Se procedió a la deshidratación en alcohol, desalcoholización en xilol, inclusión en parafina, corte, desparafinación, tinción (coloración hematoxilina-eosina) y montaje para la observación de las placas de los cerebros que fueron canulados y verificar si dicho procedimiento fue realizado de la manera correcta.

Aspectos éticos en el trabajo con animales de laboratorio. Según normativa y regulaciones internacionales:

- 💡 **Reducción:** Se trabajó con un número de animales reducido
- 💡 **Manipulación:** Fueron manipulados por un personal capacitado
- 💡 **Ambiente:** Permanecieron en un medio adecuado con óptima temperatura, ventilación, nivel de humedad e iluminación.
- 💡 **Intervenciones:** se garantizó el no sufrimiento del animal durante los procedimientos (Armas GE, 2014)

Análisis estadístico: Los datos obtenidos fueron organizados para su análisis en tablas de resultados en el Excel, se calculó el promedio

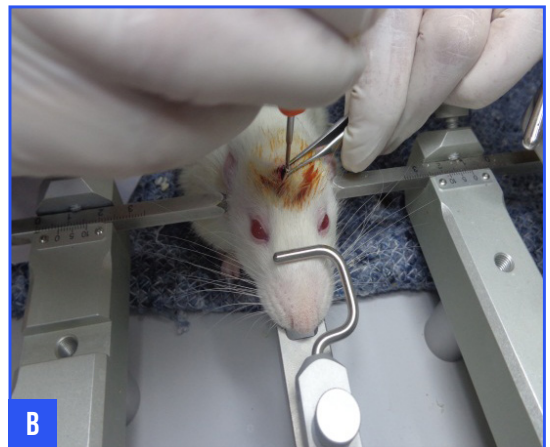
por grupos, se realizó el análisis de varianza de un factor y se comprobó la significancia entre los grupos con el Test de Tukey.

Limitaciones del estudio: Durante la intervención quirúrgica se tuvo baja de animales por anestesia, procediéndose al reemplazo para mantener el n=6 por grupo.

RESULTADOS

En cumplimiento de lo planificado para el experimento se contaron con 24 ratas macho entre 300 – 400 gramos de peso que se distribuyó al azar entre los diferentes grupos de estudio. La preparación de los animales se realizó a través de cirugía estereotáxica colocándose una cánula en tercer ventrículo, la intervención quirúrgica se realizó según protocolo, produciéndose 8 bajas de animales operados atribuibles a complicaciones por anestesia con hidrato de cloral al 8%. Se canularon un total de 20 ratas que después de la cirugía tuvieron 5 días de recuperación para posteriormente realizar la prueba.

A la conclusión de los experimentos se obtuvo los cerebros y se verificó en los grupos experimentales la ubicación de la cánula mediante



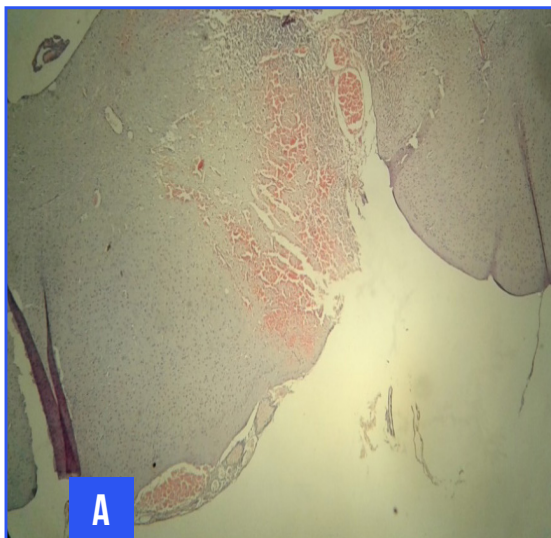
A. Cirugía estereotáxica de cerebro de rata B. Introducción de cánula en tercer ventrículo



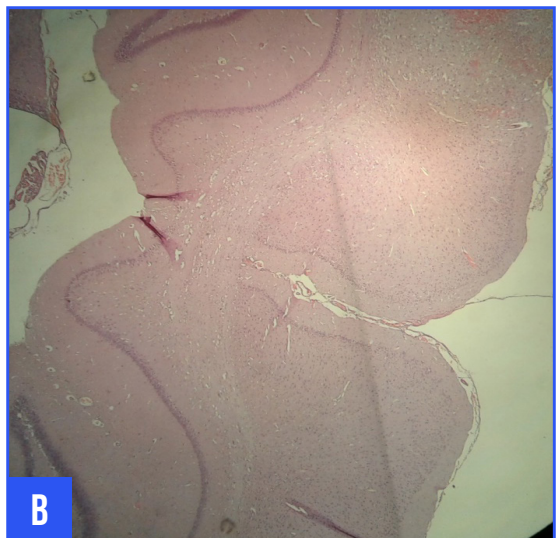
Rata postoperada en recuperación de la anestesia, recibiendo analgésico en el agua que toma del bebedero.

procesado histológico. Se realizó el procesado de 24 cerebros, de los cuales se obtuvieron 70 placas histológicas, distribuidos de la siguiente manera:

- ❖ Grupo control sin cánula: 6 cerebros
- ❖ Grupo con cánula que no fue sometido a estrés: 6 cerebros
- ❖ Grupo con cánula sometido a estrés que no recibe Allo: 5 cerebros
- ❖ Grupo con cánula que recibe Allo: 7 cerebros



A



B

A. Cánula puesta de manera incorrecta donde se observa lesión en el lugar en el que se inserta la cánula. B. Cánula puesta de manera correcta, no se observa lesión en el lugar de inserción.

A través del estudio microscópico se reemplazaron 3 ratas en las que la cánula no estaba en la ubicación precisa y fueron destinadas al grupo experimental sin administración de Allo.

Cumpléndose el n=6 por grupo de estudio.

La inducción del estrés se realizó a través de la inmovilización durante una hora, previo a realizar el test Elevated Plus Maze que valora el nivel de estrés logrado.



Inmovilización durante 1 hora para desarrollo del estrés.

Con estos procedimientos se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 1. Test elevated Plus Maze en ratas control Sprague Dawley machos no operadas, no estresadas y no tratadas con Allo. LABINCIMED. 2017

En la tabla 1 se observa resultados del test Elevated Plus Maze que valora ansiedad, con un mayor tiempo de exploración en brazo abierto correspondiente al grupo control.

RATA	TIEMPO EN BRAZO ABIERTO	EXPLORACION EN BRAZO ABIERTO	TIEMPO EN BRAZO CERRADO	EXPLORACION EN BRAZO CERRADO
R1	113	11	7	2
R2	85	6	35	6
R3	104	6	16	4
R4	88	8	32	4
R5	96	9	24	2
R6	81	1	39	8
Promedio	94,5	6,8	25,5	4,3

Fuente: elaboración propia

TABLA 2. Test Elevated Plus Maze en ratas Sprague Dawley machos operadas, no estresadas y no tratadas con Allo. LABINCIMED. 2017

En la tabla 2 se observa una reducción del tiempo de exploración de brazos abiertos y aumento en la exploración de brazos cerrados en el test Elevated Plus Maze.

RATA	TIEMPO EN BRAZO ABIERTO	EXPLORACION EN BRAZO ABIERTO	TIEMPO EN BRAZO CERRADO	EXPLORACION EN BRAZO CERRADO
R1	108	6	12	2
R2	78	1	42	4
R3	36	4	84	7
R4	101	10	19	4
R5	120	5	0	0
R6	79	7	41	8
Promedio	87,0	5,5	33,0	4,2

Fuente: elaboración propia

TABLA 3. Test Elevated Plus Maze en ratas Sprague Dawley machos operadas, estresadas y no tratadas con Allo. LABINCIMED. 2017

En la tabla 3 se observan los resultados de la aplicación del test al grupo de ratas estresadas y que no recibieron el tratamiento, encontrándose mayor permanencia en brazos abiertos.

RATA	TIEMPO EN BRAZO ABIERTO	EXPLORACION EN BRAZO ABIERTO	TIEMPO EN BRAZO CERRADO	EXPLORACION EN BRAZO CERRADO
R1	22	3	101	7
R2	82	7	39	4
R3	75	4	45	4
R4	74	5	56	5
R5	98	7	23	3
R6	70	6	48	5
Promedio	70,2	5,3	52,0	4,7

Fuente: elaboración propia

TABLA 4. Test Elevated Plus Maze en ratas Sprague Dawley machos operadas, estresadas y tratadas con Allo. LABINCIMED. 2017

RATA	TIEMPO EN BRAZO ABIERTO	EXPLORACION EN BRAZO ABIERTO	TIEMPO EN BRAZO CERRADO	EXPLORACION EN BRAZO CERRADO
R1	120	4	0	0
R2	114	4	6	0
R3	120	2	0	0
R4	120	2	0	0
R5	120	1	0	0
R6	120	1	0	0
Promedio	119,0	2,3	1,0	0,0

Fuente: elaboración propia

En la tabla 4 se observa la mayor exploración de los brazos abiertos en el test Elevated Plus Maze por el grupo con inducción del estrés y que recibió el tratamiento con Allo.

TABLA 5. Comparación de permanencia en brazos abiertos en el Test Elevated Plus Maze de ratas Sprague Dawley machos. LABINCIMED. 2017

Grupo	Control	Operada	Operada estresada	Op St Allo
	No op no st no allo	Op no st no allo	Op Est no allo	Op Est + allo
1	113	108	22	120
2	85	78	82	114
3	104	36	75	120
4	88	101	74	120
5	96	120	98	120
6	81	79	70	120
Promedio	94,5	87,0	70,2	119,0

Fuente: elaboración propia

En la tabla 5 se compara el tiempo de permanencia en los brazos abiertos de los grupos de estudio, encontrándose una mayor exploración en el grupo experimental que recibió el tratamiento con Allo. La probabilidad de que la diferencia obtenida sea debida al azar es menor al 1% ($p < 0,01$). La diferencia es muy significativa. Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias. Se detectó diferencia significativa en el grupo tratado con Allo y el grupo de ratas operadas y estresadas ($p < 0,05$)

TABLA 6. Comparación en permanencia en brazos Cerrados en el Test Elevated Plus Maze en ratas Sprague Dawley machos. LABINCIMED. 2017

Grupo	Control	Operada	Operada estresada	Op Est Allo
	No op no Est no Allo	Op no Est no Allo	Op Est no Allo	Op Est + Allo
1	7	12	101	0
2	35	42	39	6
3	16	84	45	0
4	32	19	56	0
5	24	0	23	0
6	39	41	48	0
Promedio	25,5	33,0	52,0	1,0

Fuente: elaboración propia

En la tabla 6 se observa mayor permanencia de los animales en el brazo cerrado en el grupo experimental que fue sometido a estrés y que no recibió el tratamiento con Allo. La probabilidad de que la diferencia obtenida sea debida al azar es menor a 1% ($p < 0,01$). La diferencia es muy significativa. Se rechaza la hipótesis de igualdad de medias.

DISCUSIÓN

El test para valoración del nivel de estrés aplicado fue el Elevated Plus Maze, nuestros resultados indican diferencias significativas entre los grupos en estudio, el grupo experimental que recibió Allo registró mayor exploración de brazos abiertos, comprobándose el efecto ansiolítico de Allo. Confirmando este hallazgo el menor tiempo de exploración de brazos cerrados registrada por este mismo grupo tratado con Allo. En el test de Tukey se identificó las diferencias encontradas entre el grupo que recibió tratamiento con Allo y el grupo de ratas operadas que se sometieron a estrés, confirmando el efecto ansiolítico de Allo; pero no el efecto neuroprotector (Wang JM, 2014), la evidencia de ausencia de este efecto se encuentra en la mayor exploración de brazos cerrados en el grupo de ratas operadas, estresadas y que no recibieron el tratamiento con Allo, comparado con el grupo control.

La progesterona y sus metabolitos pueden inducir acciones ansiolíticas y antidepresivas mediadas por la activación del complejo receptor GABAA, un efecto similar al producido por la mayoría de los fármacos ansiolíticos conocidos. Ciertos neuroesteroides, y en particular los derivados 3 α de la progesterona, se comportan como moduladores alostéricos positivos de los receptores GABAA (Martín-García E, 2007; Riveros-Barrera I, 2014), entre estos derivados se encuentra Allo.

En los experimentos en animales de laboratorio se ha observado el efecto ansiolítico de la progesterona, que se atribuye, principalmente, a su metabolito reducido, la Allo (Riveros-Barrera I, 2014).

Algunos estudios han demostrado que el estradiol es un supresor más potente de la liberación de GnRH / LH en los machos (Ruka KA, 2016) a través de receptores específicos, modulando la actividad de los esteroides endó-

genos, sin embargo, aunque las ratas machos tienen reducidos el número de receptores para esteroides femeninos se ha obtenido efecto ansiolítico de Allo administrada intracerebralmente.

El efecto ansiolítico de Allo demostrado en esta fase I de experimentación, plantea la posibilidad de extrapolar nuestros resultados para uso de este neuroesteroide en tratamientos de humanos, que a través de estudios clínicos experimentales de fase II podría comprobarse estos efectos para su posterior recomendación como agente terapéutico coadyuvante en el tratamiento del estrés y ansiedad generalizada de varones y mujeres en el climaterio.

En conclusión, los resultados confirman el efecto ansiolítico de Allo; aunque no se ha comprobado la función neuroprotectora en ratas adultas. En consecuencia, Allo podría emplearse como complemento en terapia ansiolítica, ya sea para reducir dosis o tiempo de tratamiento con benzodiazepinas.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ❖ Pallarès Añó M. (2007) Neuroesteroides y adicción alcohólica. Revista Española de Drogodependencias 32 (4) 544-558.
- ❖ Wang JM, et al. (2010) Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 107, no 14, p. 6498-6503.
- ❖ Chen, Shuhua, et al. (2011) Allopregnanolone promotes regeneration and reduces β -amyloid burden in a pre-clinical model of Alzheimer's disease. PloS one, vol. 6, no 8, p. e24293.
- ❖ Brinton RD. (2013) Neurosteroids as regenerative agents in the brain: the-

- rapeutic implications. *Nature reviews Endocrinology*; **9**(4), 241-250.
- ❖ Wang, J. M. (2014) Allopregnanolone and neurogenesis in the nigrostriatal tract. *Frontiers in cellular neuroscience*; **8**.
 - ❖ Haseitel M, Silva E. (2015) Trastornos hormonales en pacientes con epilepsia. *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*; **52**(2), 108-112.
 - ❖ Martín-García E, Darbra S, Pallarès M. (2007) Implicación de los neuroesteroides en la conducta normal y Patológica. *Rev. Neurol.*; 44 (11): 661-676
 - ❖ Riveros-Barrera I, Dueñas Z. (2014) Efecto de la alopregnanolona sobre la ansiedad en ratas con separación materna durante la lactancia. *Rev. Fac. Med. Vol. 62 No. 2*: 229-236.
 - ❖ Sánchez-Ramírez, J. D., & Uribe-Velásquez, L. F. (2009). Aspectos neurobiológicos implicados en el miedo animal. *Biosalud*, **8**(1), 189-213.
 - ❖ Franco AJ, Chen Ch, Scullen T, Zsombok A, Salahudeen AA, Di Sh, Herman JP, Tasker JG. (2016) Sensitization of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in a Male Rat Chronic Stress Model. *Endocrinology*; 157 (6): 2346-2355. doi: 10.1210/en.2015-1641
 - ❖ Pedersen AL, Nelson LH, Saldanha CJ. (2016) Centrally Synthesized Estradiol Is a Potent Anti-Inflammatory in the Injured Zebra Finch Brain. *Endocrinology*; 157 (5): 2041-2051. doi: 10.1210/en.2015-1991
 - ❖ Padhy G., Sethy N. K., Ganju L., Bhargava K. (2013) Abundance of plasma antioxidant proteins confers tolerance to acute hypobaric hypoxia exposure. *High altitude medicine & biology*; **14**(3), 289-297.
 - ❖ Mittelman-Smith MA, Krajewski-Hall SJ, McMullen MT, Rance NE. (2016) Ablation of KNDy Neurons Results in Hypogonadotropic Hypogonadism and Amplifies the Steroid-Induced LH Surge in Female Rats. *Endocrinology*; 157 (5): 2015-2027. doi: 10.1210/en.2015-1740
 - ❖ León R, Pentón G, Almaguer W, Marín J, Cruz A, Lorigados L, Blanco L, Estupiñán B, Merceron D, Macías L, Bergado J, Pavón N. (2015) Modelo experimental de hipoperfusión cerebral produce déficit de la memoria y aprendizaje y modificaciones en la expresión de genes. *Acta biol. Colomb*;20(1):15-25.
 - ❖ Serebrovskaya, T. V., Nosar, V. I., Bratus, L. V., Gavenauskas, B. L., & Mankovska, I. M. (2013) Tissue oxygenation and mitochondrial respiration under different modes of intermittent hypoxia. *High altitude medicine & biology*; **14**(3), 280-288.
 - ❖ Li, Xiangyang, et al. (2014) The activity, protein, and mRNA expression of CYP2E1 and CYP3A1 in rats after exposure to acute and chronic high altitude hypoxia. *High altitude medicine & biology*; 15.4: 491-496.
 - ❖ Troncoso, J., Lamprea, M., Cuestas, D., & Múnera, A. (2010). El estrés agudo interfiere con la evocación y promueve la extinción de la memoria espacial en el laberinto de Barnes. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 207-221.
 - ❖ Armas González E; Cabezas Alfonso H; González Mompeller M; Díaz del Pino R. (2014) Influencia de distintos niveles de ácido fólico en defectos del cierre del tubo neural en ratas Wistar. *Génética Comunitaria. Cuba*.
 - ❖ Ruka KA, Burger L.L, Moenter SM. (2016) Both Estrogen and Androgen

Modify the Response to Activation of Neurokinin-3 and κ -Opioid Receptors in Arcuate Kisspeptin Neurons From Male Mice. **Endocrinology**; 157 (2): 752-763. doi: 10.1210/en.2015-1688