



El efecto ansiolítico de testosterona en ratas macho no se debe a la aromatización de estrógeno: evidencias preliminares.

Yunes R., Boulin F. y Cabrera R.

Area Farmacología. Departamento Patología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU). Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Palabras clave: testosterona, estrógeno, rata macho

Key words: testosterone, estrogen, male rat

Resumen

Se sabe que testosterona (T) y sus metabolitos dihidrotestosterona y 3α -androstane-20-one presentan propiedades ansiolíticas en modelos animales de ansiedad. Sin embargo, y dado que T puede ser aromatizada a estradiol (E2), no se puede descartar un rol ansiolítico de este último compuesto orgánico. En este trabajo, mediante la utilización de ratas macho intactas y castradas, y empleando T o E2 como terapia de reemplazo, pudimos comprobar que E2 no posee efectos ansiolíticos, en tanto sí están presentes posterior a la impregnación con T o eventualmente con sus metabolitos no aromatizables.

Abstract

It has been reported that testosterone (T) and its metabolites dihydrotestosterone and 3α -androstane-20-one exhibit anxiolytic properties. However, and since T is also usually aromatized to estradiol (E2), it has not been ruled out the possibility of E2 being responsible for the aforementioned effect, at least partially. In this report, by using intact and castrated male rats, with or without E2 or T replacement, we could conclude that the anxiolytic effect is not due to E2 but to T and, eventually its non aromatizable metabolites.

Introducción

Diversas evidencias sustentan el hecho que las mujeres resultan más vulnerables a los trastornos de ansiedad, presentando un 85% más de posibilidades que los hombres de padecer dichos trastornos (1). Esto ha sugerido la posibilidad de que los andrógenos estarían ejerciendo algún rol protector en relación con la ansiedad (2). Ciertamente no se pueden descartar las influencias culturales y sociales, pero resulta sugerente que los trastornos de ansiedad se hacen particularmente evidentes en el sexo femenino cuando los niveles circulantes de estrógenos se elevan en la pubertad, y hasta tanto se alcance la menopausia. Si bien esto sugiere un rol para estrógenos y/o progestágenos, su contraparte resulta en la presencia de testosterona –principal esteroide androgénico– en hombre en contraposición a mujeres, y su eventual rol en el control de la ansiedad en el sexo masculino.

Es abundante la presencia de receptores de andrógenos en diversos tejidos. En el Sistema Nervioso Central (SNC) son particularmente evidentes en diferentes áreas cerebrales como la amígdala, hipocampo y corteza prefrontal (3). Diversos estudios señalan que la funcionalidad de estas estructuras, particularmente en lo relativo al aprendizaje y la memoria, puede ser modificada por la acción de andrógenos (3). Otros estudios han reportado acciones ansiolíticas y analgésicas en relación a testosterona y sus metabolitos 5α -reducidos (4). Precisamente en relación a este último punto, se ha postulado la posibilidad de que además de testosterona, sean sus metabolitos –particularmente dihidrotestosterona (DHT) y 3α -androstenediol (3α -diol)– los responsables de las acciones ansiolíticas reportadas para la primera (2). Por otro lado, tampoco puede descartarse, dada la presencia de aromatasas, la transformación de testosterona en estradiol, de modo tal que la acción ansiolítica se deba, al menos parcialmente, a la presencia de estradiol y no a testosterona (4).

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo pretende, precisamente, aportar nuevas evidencias experimentales que puedan colaborar a aclarar en parte la importante participación de esta familia de esteroides, de origen gonadal, en la regulación neuroglial de la ansiedad. Como estrategia se apela a la utilización de terapia hormonal de reemplazo con estradiol y con testosterona en animales intactos y castrados, de modo tal de verificar si precisamente la transformación de testosterona a estradiol es responsable del efecto ansiolítico de la administración de andrógenos.

Material y Métodos

Animales

Se emplearon ratas macho de nuestro bioterio, de la cepa Sprague-Dawley (adultos de 90-120 días de edad, de 250-300 gs de peso), agrupados a razón de 4-5 animales por caja. Posterior a la castración se los colocaba en cajas individuales hasta su completa recuperación. Se mantuvieron a temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) y ciclo luz-oscuridad (12/12 luz/oscuridad) constantes, con acceso a agua y alimento ad-hoc sin limitaciones. Los estudios comportamentales se llevaron a cabo entre las 12.00 y 13.00 hs. Cada animal fue utilizado por una única vez, siendo todos ellos manipulados de acuerdo a los estándares de los Institutos Nacionales de la Salud (National Institutes of Health, USA) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Reactivos

Salvo expresa mención, todos los reactivos fueron obtenidos de la firma Sigma (St. Louis, MO, USA). Las hormonas esteroideas empleadas fueron primero disueltas en propilenglicol, y luego adecuadamente ajustados a su concentración de trabajo en solución salina. En el caso de los animales controles, sólo se utilizó el propilenglicol ajustado, sin ningún principio activo añadido. La administración de reactivos se realizó por vía subcutánea, no excediendo $100\ \mu\text{l}$ como volumen final de inyección.

Evaluación comportamental

Los niveles de ansiedad en los animales fueron evaluados mediante el test en cruz elevada ("elevated plus maze", Figura 1) (5, 6), ligeramente modificado de acuerdo a Gargiulo y Donoso (7). El mismo consiste en dos brazos de madera enfrentados ($45\times 7\ \text{cm}$), dos de ellos sin paredes y dos de ellos con laterales de madera de 30 cm de altura. El aparato se ubica a 45 cm del piso, y el mismo se encuentra iluminado centralmente por una ampolla de 25 W.

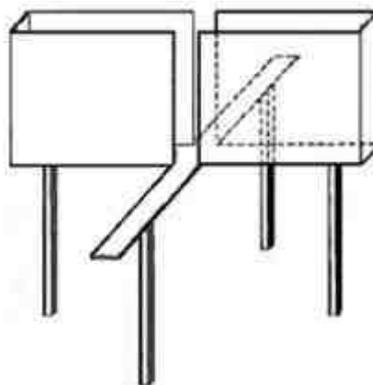


Figura 1

Previo ambientarse por 1 h al lugar de la evaluación, se colocaron en el centro del aparato mirando hacia uno de los brazos abiertos (8). Luego se medía el tiempo empleado por el animal en explorar en el brazo abierto (TSOA), el tiempo empleado en explorar el extremo distal del mismo, y el número de entradas en los brazos abiertos o cerrados (9). Para considerar una entrada en uno de los brazos el animal debía tener las cuatro patas en el segmento en cuestión. Dos medidas evaluadas adicionalmente, derivadas de las anteriores, consistieron en el Tiempo por Entrada ("Time per entry", TPE), que resulta de dividir el tiempo total de permanencia en el brazo abierto por el número de entradas a dicho brazo, y la Preferencia ("Preference", Pref), consistente en dividir el número de entradas en el brazo abierto por el número de entradas en el brazo cerrado, expresado como un porcentaje. También, y para descartar efectos inespecíficos de las drogas evaluadas sobre la actividad locomotora, se registró el número total de entradas en todos los brazos del aparato.

Procedimientos quirúrgicos y tratamientos

Todos los animales fueron castrados, con excepción del grupo control, anestesiándolos con hidrato de cloral disuelto en solución salina (NaCl 0.9%) (400 mg/kg i.p.) Se establecieron, previo estudios preliminares de factibilidad, los siguientes grupos experimentales: 1) animales control: sólo recibieron el vehículo s.c. en un volumen de 100 µl; 2) controles castrados: recuperados una semana previa a la administración s.c. de vehículo; 3) animales castrados, y recuperados por una semana: inyectados s.c. con 100 µl o 40 µl del stock de benzoato de estradiol (25 µg o 10 µg s.c. respectivamente de E2), o 100 µl con 1 mg de propionato de testosterona (T). El número de animales utilizados fue entre 8-10 por grupo. 48 hs posteriores a la administración de las diferentes drogas a estudiar, los animales fueron aclimatados en la sala de ensayo, y sometidos a la evaluación comportamental durante un período de tiempo de 5 min por sujeto.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como medias (+/- SEM) de 8-10 ratas por grupo, y se analizaron mediante el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido por el test de Newmann-Keuls para comparaciones entre grupos. $P < 0.05$ entre grupos fueron consideradas estadísticamente significativas.

Resultados

Los procedimientos quirúrgicos previos al ensayo comportamental propiamente dicho fueron satisfactorios, recuperándose los animales adecuadamente, tanto de la anestesia como del procedimiento quirúrgico en sí mismo (la morbilidad resultó menor al 1% de los animales tras siete días de recuperación postoperatoria).

Los animales controles no castrados se los consideró como representativos de lo que denominamos "niveles basales de ansiedad" frente al conflicto que representa la elección de alguno de los brazos en el test en cruz elevado (Figura 2).

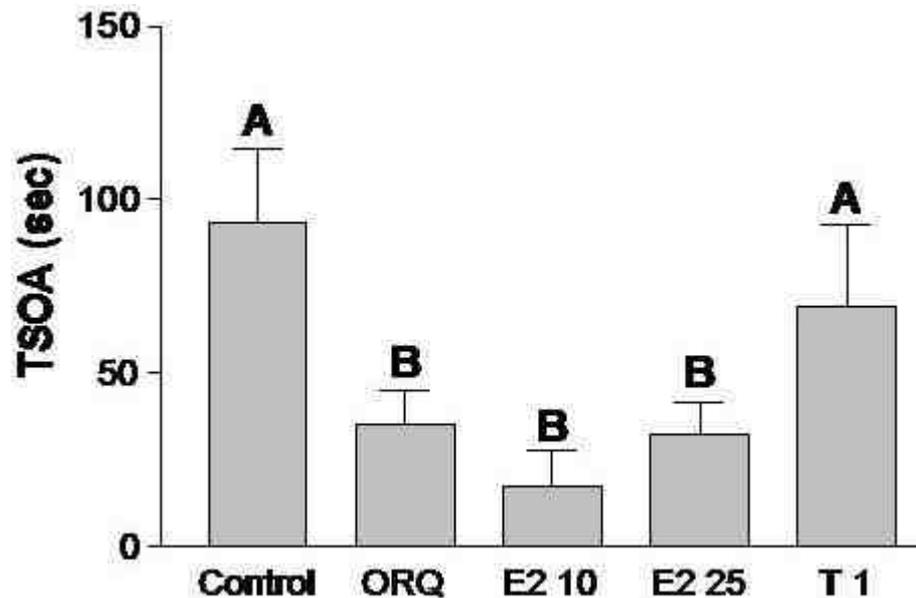


Figura 2: Tiempo, en segundos, empleado por los animales explorando el brazo abierto del aparato (TSOA). Los grupos experimentales corresponden a controles no castrados y tratados con vehículo (Control), castrados tratados con vehículo (ORQ), castrados tratados con benzoato de estradiol (E2) 10 y 25 μg por animal respectivamente, y propionato de testosterona (T) 1 mg por animal. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativamente ($P < 0.05$)

Se puede observar que la ablación quirúrgica de los testículos (principal fuente de andrógenos) indujo una disminución significativa de la tendencia exploratoria de los animales en el brazo abierto, lo que representa un claro aumento de la ansiedad frente a la situación novedosa (Figura 2). Este comportamiento no fue revertido por la administración de benzoato de estradiol (E2) en ninguna de las dos dosis ensayadas, 10 y 25 μg por animal (Figura 2). La administración de propionato de testosterona (T) (1 mg por animal) revirtió significativamente el efecto ansiogénico observado en los animales castrados y tratados con E2. Esto es, los niveles de exploración del brazo abierto –y por tanto los niveles de ansiedad– se hacen semejantes a los niveles basales (Figura 2).

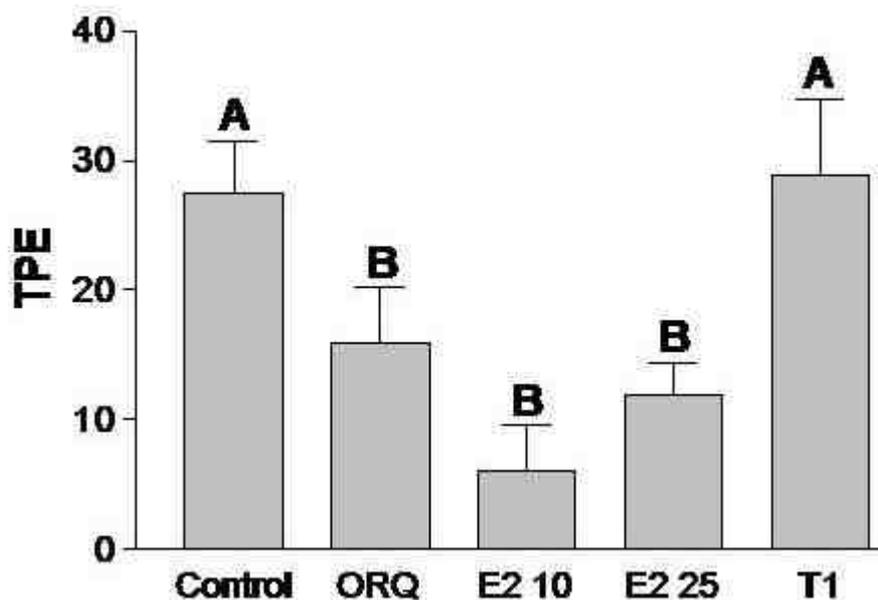


Figura 3: Tiempo por entrada en el brazo abierto (TPE). Representa un cociente entre el tiempo empleado por el animal en el brazo abierto, y el número de veces que ingresa al mismo. Los grupos experimentales corresponden a controles no castrados y tratados con vehículo (Control), castrados tratados con vehículo (ORQ), castrados tratados con benzoato de estradiol (E2) 10 y 25 μg por animal respectivamente, y propionato de testosterona (T) 1 mg por animal. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Por otra parte, y teniendo en cuenta que parte de los resultados obtenidos en este test podría reflejar cambios en el patrón general de motilidad y ser considerados, por lo mismo inespecíficos, se tomaron en cuenta otras medidas que permitieron eliminar efectos inespecíficos asociados a los diferentes tratamientos (10). Como se puede observar en la figura 3, el tiempo por entrada en el brazo abierto (TPE) sigue un patrón de desempeño similar a lo señalado en relación al TSOA (Figura 2), lo que nos indicaría que, a diferencia del grupo control y T, los otros grupos realizan entradas al brazo abierto que son globalmente de menor duración y más frecuentes (Figura 2).

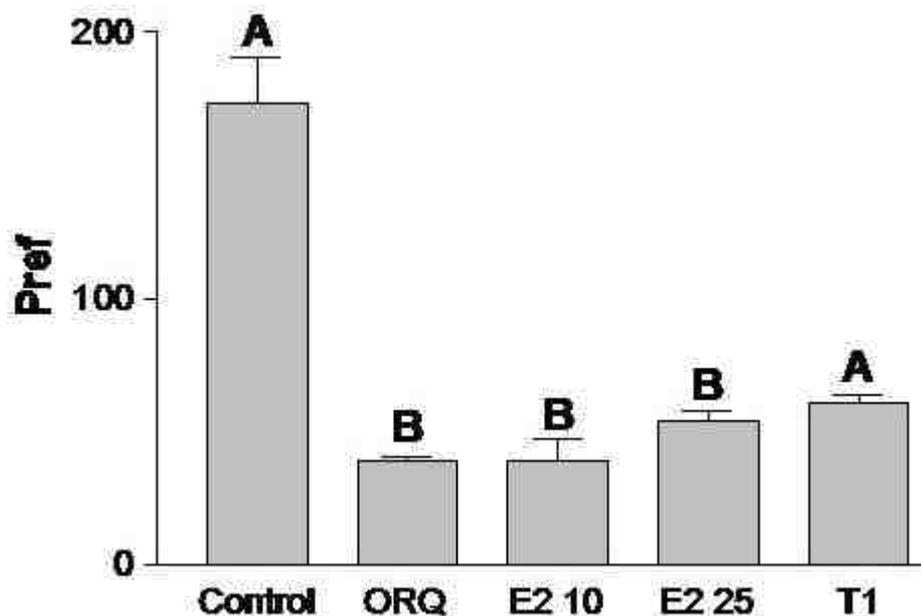


Figura 4: Preferencia (Pref). representa un cociente entre el número de ingresos en el brazo abierto y el número de ingresos en el brazo cerrado, todo multiplicado por cien. Los grupos experimentales corresponden a controles no castrados y tratados con vehículo (Control), castrados tratados con vehículo (ORQ), castrados tratados con benzoato de estradiol (E2) 10 y 25 μg por animal respectivamente, y propionato de testosterona (T) 1 mg por animal. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Como sea, los valores más elevados indican una mayor tendencia exploratoria, con menos componente ansioso en el comportamiento de los animales, no debiéndose dicha situación a un aumento inespecífico de la motilidad. Algo similar ocurre con la Preferencia de los animales (Pref), que nuevamente sigue un perfil similar a lo ya observado previamente (Figura 4). En relación a este índice debemos señalar que mayores valores indican menor ansiedad en el grupo en cuestión, que es lo que precisamente ocurre: El grupo control y el grupo T son significativamente diferentes ($P < 0.05$) con respecto a los grupos E2 en cualquiera de sus dosis (Figura 4).

Discusión

En el ámbito de la neurociencia son bien conocidas las sorprendentes diferencias que existen entre sexos en diversos aspectos, tanto estructurales como funcionales (11). En los últimos años se ha documentado, tanto en animales como en seres humanos, la influencia del sexo del individuo sobre el cerebro y variados eventos comportamentales, tales como las emociones, la visión, la audición, el procesamiento de rostros en que se basa el conocimiento y el reconocimiento, la percepción del dolor, la orientación y la navegación espacial, los niveles de neurotransmisores, entre otros (11). De particular importancia en este trabajo resultan las diferencias

sexuales vinculadas a la ansiedad y su modulación. Se ha sugerido que la ansiedad en seres humanos resulta evolutivamente análoga a la respuesta de miedo en los animales, pudiendo en este contexto considerarse a la ansiedad como un trastorno defensivo inapropiadamente activado a punto de partida de la inadecuada evaluación de amenazas potenciales (12).

Las mujeres –y por extensión también en las hembras de muchas especies de mamíferos–, por motivos que parecen tener que ver con las variaciones hormonales cíclicas durante su edad reproductiva, son más propensas a presentar cuadros ansiosos y depresivos que los hombres (1, 13). Se ha reportado un efecto ansiolítico para testosterona (T) en machos de diversas especies de roedores (14) y que dicha acción podría resultar parcialmente mediada no sólo por T sino por sus metabolitos 5α - (dihidrotestosterona, DHT) y 3α -reducidos (3α -androstanoediol) (4). Apoyando esta evidencia se ha podido establecer que ratas en proestro – periodo del ciclo en que existe un aumento relativo en la concentración circulante de andrógenos– presentan menos ansiedad que los animales en diestro (14). Adicionalmente, se sabe que la inyección de flutamida –un antagonista de los receptores de andrógenos– en el hipocampo de ratas macho intactas y con terapia de reemplazo con DHT produce un aumento significativo de la ansiedad (2).

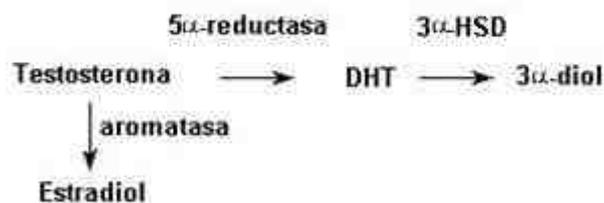


Figura 5: DHT = dihidrotestosterona; 3α -HSD = 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3α -diol = 3α -androstanoediol.

Como puede verse, en este trabajo la evidencia sugiere fuertemente las propiedades de T como un efectivo ansiolítico en animales bajo diversas condiciones ansiogénicas. Sin embargo, no puede descartarse que el efecto ansiolítico observado pueda deberse, al menos parcialmente, a la aromatización de T a estradiol (E2) (4) (Figura 5). De hecho, E2 es capaz per-se de disminuir la ansiedad en seres humanos y animales. Se sabe que los metabolitos DHT y 3α -diol no son aromatizables y no obstante ello poseen la propiedad de disminuir la ansiedad. Esto nos permite proponer que E2 no sea el único responsable de mediar la respuesta ansiolítica observada. Sin embargo, en el presente trabajo hemos podido mostrar que la castración en machos aumenta la ansiedad significativamente, de forma espontánea, evaluada en el test en cruz elevada, y que dicha situación no pudo ser revertida con la administración s.c. de E2 (Figura 2), en sí se revierte con la administración sistémica de T (Figura 2). Adicionalmente, hemos podido descartar que estos efectos sean inespecíficos por aumento de la motilidad (Figura 3) o falsos positivos (Figura 4). De esta forma, podemos concluir que los efectos ansiolíticos de T se deben, por su

acción intrínseca o por la de sus metabolitos –o ambas situaciones–, a la acción de andrógenos y no a la aromatización de T a E2.

Es nuestra intención profundizar en el estudio de este tema, apelando a diversas estrategias experimentales tendientes a precisar el efecto ansiolítico observado, como también la estructuras que resultan el sustrato de T. Adicionalmente, la importancia de este tema reside en la posible utilización de T (y/o sus metabolitos no aromatizables) como eventual estrategia terapéutica en casos de disminución fisiológica (andropausia) o patológica de los niveles circulantes de andrógenos, no ya como un modo de sostener las funciones relativas a la sexualidad, sino por su capacidad de inducir cambios positivos en el ámbito cognitivo y el afectivo vinculado a la ansiedad.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5942), y por la Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado (SECTyP, Resolución nº 658/05-R) de la Universidad Nacional de Cuyo.

Bibliografía

1. Cloitre M, Yonkers K, Pearlstein T, Altemus M, Davidson K., Pigott T, Shear M, Pine D, Ross J, Howell H, Brogan K, Rieckmann N, Clemow L. Women and anxiety disorders: implications for diagnosis and treatment. *CNS Spectr* 2004, 8: 1–16
2. Edinger K, Frye C. Intrahippocampal administration of an androgen receptor antagonist, flutamide, can increase anxiety-like behavior in intact and DHT-replaced male rats. *Horm Behav* 2006, 50(2): 216-222.
3. Janowsky J. Thinking with your gonads: testosterone and cognition. *Trends Cog Sci* 2006, 10:77-82
4. Edinger, K, Frye, C. Testosterone's anti-anxiety and analgesic effects may be due in part to actions of its 5 α -reduced metabolites in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinol* 2005; 30:418–430
5. Pellow S, File S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1986, 24:525-529
6. Dawson G, Tricklebank M. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci* 1995, 16:33-36
7. Gargiulo P, Donoso A. Distinct grooming patterns induced by intracerebroventricular injection of CRH, TRH and LHRH in male rats. *Braz J Med Biol Res* 1996, 29:375-379
8. Rodgers R, Johnson J. Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1998, 59:221-232

9. Montgomey K. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Psychol* 1995, 48:254-260
10. Laconi M, Casteller G, Gargiulo P, Bregonzio C, Cabrera R. The anxiolytic effect of allopregnanolone is associated with gonadal hormonal status in female rats. *Eur J Pharmacol* 2001, 417:111-116
11. Cahill L. Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 2006, AOP; doi: 10.138/nrn1909:1-8
12. Palanza P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci Behav Rev* 2001, 25:219-233
13. Kessler R. Epidemiology of women and depression. *J Affect Dis* 2004, 74:5-813
14. Frye C, Seliga A. Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cog Affect Behav Neurosci* 2001, 1:371-381