



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“El Flunitrazepam inhibe la hiperexcitabilidad
neuronal inducida por GABA.
Estudio electrofisiológico y farmacológico en el
área CA1 del hipocampo”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A

URI NIMROD RAMÍREZ JARQUÍN



TUTOR:

DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

<p>1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre (s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de Cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno Ramírez Jarquín Uri Nimrod 53537245 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301100786</p>
<p>2. Datos del tutor Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor Dr Jaime Eduardo Calixto González</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>4. Datos del sinodal 2 Dr César Casasola Castro</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>5. Datos del sinodal 3 M. en C. José Luis Arreola Ramírez</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre (s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>6. Datos del sinodal 4 Psicol. Karina Simón Arceo</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Título Subtítulo Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito. El Flunitrazepam inhibe la hiperexcitabilidad neuronal inducida por GABA. Estudio electrofisiológico y farmacológico en el área CA1 del hipocampo. 74 2007</p>



El presente trabajo de Tesis fue realizado en el laboratorio de Neurobiología de la División de investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”

Mi agradecimiento

Con agradecimiento especial a los revisores de la presente Tesis

Dra. Blaca M. Bazán P
Dr. César Casasola C
Dr. Eduardo Calixto G
Psic. Karina Simón-Arceo
M. en C. José Luis Arreola R
Lic. en Quim. Clin. Edgar Flores S

México D.F., septiembre 2007

Un paso más en un camino por descubrir,

El mayor de los respetos y gratitudes así como la más grande admiración para aquellos quienes con la mejor escuela (el ejemplo) me han formado y enseñado a disfrutar, amar, sufrir y gozar el mayor regalo que me dieron... la vida

mis amados padres:

Camelia Jarquín López
Y
Francisco Ramírez

Para los que como yo han tenido la fortuna de poder recibir las enseñanzas de estas dos grandísimas personas. Para los que con sus conocimientos, experiencia y su excepcional forma de ser y actuar han sabido aprovecharlas. Y que tuve la fortuna de estar con ellos, quienes en igual magnitud admiro, aprecio y respeto

mis amados hermanos:

Arely Esmeralda Ramírez Jarquín
Y
Josué Orlando Ramírez Jarquín

A la persona que desde que se acerco a mi vida, me ha brindado un motivo nuevo para seguir cada vez que caigo o tropiezo, y una luz más en los momentos de oscuridad y cuyo amor es diferente al de un amigo amiga o familiar

mi amada:

Lorena Hernández García

Muchas Gracias Familia

Un paso más en un camino por descubrir

En el que nunca estaré solo...

GRACIAS....

Agradecimientos:

A mis padres **Camelia Jarquín López** y **Francisco Ramírez**, por todo el amor, apoyo y paciencia – entre otras muchas otras cosas más- que me han dado y todo lo que han enseñado.

A mis carnales **Josué Orlando Ramírez Jarquín** “el flaco” y **Arely Esmeralda Ramírez Jarquín** “la chatita, la chachita, etc., etc.”, por aguantar mis arranques y alguna que otra broma.

A mi chaparrita **Lore** por ser tan chida conmigo, gracias amor.

Al mero-mero, al master de master, al jeday de los jeday al mismísimo **Dr. Eduardo Calixto González**, por darme la oportunidad y privilegio de ser su primer hijo académico, además por aguantarme, consentirme, soportarme, y por darme toda la tolerancia y paciencia que ha podido –que es mucha-, y aún más por permitirme considerarlo como un amigo.

A **Karina Simon Arceo** -que es Doctora pero no le gusta que le digan así, por eso no lo menciono- por apoyarme y darme los consejos y palabritas de aliento justo en el momento indicado, y por ser una gran amiga. Y también por las chelas que un día va a invitar.

A mis padrinos **Ligorio Juárez Ramírez** y **Lucia Gutiérrez Guzmán** por que siempre han estado conmigo en cualquier situación y lo seguirán haciendo, además por el gran ejemplo que nos han puesto que es un logro más para toda la familia.

A mi tío **Alfredo Jarquín López** por su gran ejemplo a seguir como ser humano.

A mi tío **Jaime Ramírez Juárez** “el Jaimo”, a su esposa mi tía **Cata**, mis primos y primas: **Carmela, Eloy, Florinda, Valentina, Amador**, por su gran apoyo, cariño, y darnos siempre un lugarcito en su hogar.

A mi tío **Bertario Ramírez**, mi tía **Blanca Estela Hernández**, mis primos **Rolando, Ma. De Lourdes, Mónica** y **Virginia Ramírez Hernández**, por su gran afecto, amistad y compañía.

Al tío **Domingo Ramírez Juárez**, mi tía **Paula Ríos- Gutiérrez**, y mis primos **Rene-Rodrigo, Sergio-Octavio, Leonel**, y la prima **Estela Ramírez Ríos**, por convivir aun que sean unos pocos momentos pero eso si bien alegres, y por su apoyo y consejos.

A mi tía **Felipa Juárez Ramírez**, por el gran esfuerzo que le pone a las cosas, por las ganas de seguir que siempre muestra por la superación y el deseo de ser mejores cada día, por el gran ejemplo que me da.

Al Che, mi primo **José Juan Jarquín Cortés** y su esposa, mi tía, **María López Hernández, Nieves**, por los momentos y viajes juntos, muy bonitas experiencias, y por las que están por venir.

A mí tía **Antoniana Jarquín L.** y mis primos **Elvia, Jaciel** y **Rebeca**, por su cariño y cuidados.

A mis abuelitas

A mis otros hermanos:

Al “güero” **Miguel Martínez Cuevas**, por su amistad incondicional y que tiene todo mi respeto y cariño; Al “ballo” **Javier Martínez Cano** que corrigió el rumbo y se junto con los buenos; Al “Abuelo” **Abraham Reyes Cadena** aunque un poquito raro pero es bien chido y es un amigo de confianza; Al “gordo” **Noe Ramírez Muñoz**, pus la neta nomás porque siempre le rompía sus ropitas en el tocho, no cierto carnal; Al “pipo” por invitarme a comer a las pipo tortas, y ser un amigo bien aliviado; Al **Ángel Martínez Cuevas** otro bien a todo dar; Al “Fubú” **Raul Rivera Zuñiga**. Y pos claro al manits al manatí mayor **Gerardo David Anaya Eugenio** por todas las prácticas de campo, prácticas serias y de trabajo, y los consejos y pláticas. Y a todos, la neta nomás por ser mis otros carnales.

Y a mis otros tantos y poquitos amigos de la facultad de Ciencias: “**Anits**”, “el chino” **Raúl**, “Oruga” **Marco, Diana** “mocos”, **Verónica, Bere-nice, Ricardo “El mofín**”, “Maridobi de las Praderas” **Marisol**. Y a todos los que se hayan escapado pero es necesario terminar, una disculpa gracias. Por ultimo a **Dios** que siempre me ayudado a mí a mis seres queridos y nos ha permitido continuar caminando sobre lo que decidimos, GRACIAS.

I Índice

	Página
I Índice	5
Lista de abreviaturas	6
II Introducción	7
1.-Neurotransmisión GABAérgica	8
1.1 Síntesis y metabolismo del GABA	8
1.2 Recaptura del GABA	10
1.3 Fisiología de la neurotransmisión GABAérgica	10
1.4 El receptor GABA _B	12
1.5 El receptor GABA _A	13
1.6 Modulación alostérica del receptor GABA _A	15
1.7 Distribución del receptor GABA _A en el SNC	16
2.-Síndromes de abstinencia relacionados con la neurotransmisión GABAérgica	19
2.1 Conceptos básicos: tolerancia y dependencia	19
2.2 Abstinencia a Bzs y barbitúricos	21
2.3 Abstinencia al alcohol	22
2.4 Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia	23
2.5 Síndrome de abstinencia al GABA (SAG)	25
3.-Farmacología del Fnz	27
3.1 Farmacodinámica y farmacocinética del Fnz	32
3.2 El Síndrome de Abstinencia a Fnz	33
III Justificación de la realización de esta tesis	34
IV Objetivo	35
V Planteamiento del problema	35
VI Hipótesis	36
VII Material y Métodos	37
VIII Resultados	41
IX Discusión	53
X Conclusiones	60
XI Referencias	61

Lista de abreviaturas

aloP	alopregnanolona, tetrahidroprogesterona, 3 α -OH dihidroprogesterona.
AMPA	ácido metil-3-hidroxi 5-metil 4-oxazole propiónico
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucléico
Bic	bicuculina
Bz	benzodiazepina
CA1	área CA1 del hipocampo (CA cuerpo de Ammon)
Ca ²⁺	ión calcio
Cl ⁻	ión cloro
Dz	diazepam
DSI	despolarización inducida por supresión de la inhibición (por sus siglas en inglés)
EEG	electroencefalograma, electroencefalográfico
EP (ó SP)	espiga poblacional (por sus siglas en inglés)
fEPSP	potencial postsináptico excitatorio de campo (por sus siglas en inglés)
Fnz	flunitrazepam
GABA	ácido (γ) gamma aminobutírico (4-aminobutirato)
GABA _A	receptor ionotrópico de GABA (receptor tipo A)
GABA _B	receptor metabotrópico de GABA (receptor tipo B)
GABA-T	enzima GABA-transaminasa
GAD	enzima glutamato descaboxilasa o L-glutamato 1-carboxilasa-liasa.
GHB	ácido γ -hidroxi-butírico
GLU	glutamato o ácido glutámico
GLN	glutamina
h	hora (s)
IPSP	potencial post-sináptico inhibitorio
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”
K ⁺	ión potasio
K _e ⁺	potasio extracelular
min	minuto (s)
Na ⁺	ión sodio
NMDA	N-metil D-aspartato
PDS	despolarizaciones paroxísticas de gran amplitud
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PLP	fosfato de piridoxal
SAG	Síndrome de Abstinencia al GABA
SNC	sistema nervioso central
TACA	ácido trans-4 aminocrotonico
TM	dominio transmembranal
2-DG	2-desoxi-glucosa
TBPS	T-butilbiclofosforotionato
DSM-IV	Manual de diagnóstico y estadístico de los transtrornos mentales

II Introducción

Un conocimiento básico en las neurociencias y las farmacodependencias es que la administración crónica de drogas que incrementan la actividad GABAérgica, como las benzodiazepinas (Bzs), los barbitúricos o el alcohol, generan tolerancia y dependencia. La suspensión abrupta de la administración de estas drogas favorece a largo plazo la aparición de estados neurológicos caracterizados por cambios en la actividad sensorial-perceptiva, alucinaciones y en casos extremos, crisis convulsivas.

La privación súbita de la infusión de GABA (ácido (γ) gamma amino butírico ó 4-aminobutirato) en el hipocampo de la rata genera cambios electrofisiológicos tendientes al incremento de la excitabilidad neuronal y que estos eventos pueden ser prevenidos por la administración del agonista completo de las Bzs (o GABAérgico) el flunitrazepam (Fnz). Estos hallazgos son el sustento electrofisiológico y farmacológico de la línea de investigación del departamento de Neurobiología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente” (INPRF). La hipótesis general de nuestro grupo de investigación sostiene que es posible bloquear o atenuar las modificaciones de la neurotransmisión GABAérgica (por ejemplo: disminución de la síntesis del GABA y del número de receptores para el aminoácido, asimismo, cambios en la conformación de los receptores que lo reconocen) inducidas por GABA si un ligando o fármaco que reconozca al receptor post-sináptico de GABA cumple con dos requisitos básicos: 1) una exposición previa corta y 2) cuya concentración por si sola no genere abstinencia.

En la introducción de esta tesis se enmarcan los aspectos básicos de la neurotransmisión dependiente del GABA, sus receptores, su fisiología y su importancia en el cerebro, específicamente en el hipocampo. Posteriormente, se hace énfasis en los mecanismos en común de las abstinencias y lo referente a la abstinencia a GABA *in vitro*, describiéndolo como el bioensayo farmacológico y electrofisiológico para el estudio de las abstinencias GABAérgicas. La justificación de la presente tesis y que enmarca a los objetivos generales, se relaciona con el manejo y mal uso de las Bzs y la posibilidad de dar una nueva estrategia en la terapéutica y prevención de las abstinencias farmacológicas por el abuso de Bzs, utilizando para ello al Fnz como representante de este grupo. En material y métodos se describen las técnicas utilizadas y los análisis que fueron necesarios para la obtención de los resultados. La última parte de este volumen contiene la discusión de los

resultados y las conclusiones de la presente tesis en la que confirmamos que la hiperexcitabilidad neuronal del área CA1 del hipocampo inducida por abstinencia a GABA puede bloquearse por el tratamiento previo y corto de Fnz.

1.- Neurotransmisión GABAérgica

1.1 Síntesis y metabolismo del GABA

Un neurotransmisor ejerce un efecto inhibitor cuando es capaz de deprimir la excitabilidad neuronal. Durante la inhibición se disminuye la probabilidad de que una neurona genere potenciales de acción. En el hipocampo y en la corteza cerebral la inhibición se produce por circuitos neuronales locales establecidos por interneuronas, de las cuales, más del 90% son GABAérgicas (Nurse y Lacaille, 1997). Estas células inhiben a las neuronas de proyección (piramidales), lo cual establece una de las más importantes regulaciones de la excitabilidad del sistema nervioso central (SNC; Luddens et al., 1995).

El GABA fue descubierto en 1950 por Eugene Roberts (Krnjević, 1991) y fue hasta 1957 cuando se publicó la primera evidencia que sugería que el GABA era un neurotransmisor. Bazemore y colaboradores (1956) identificaron una sustancia endógena o “factor I” como responsable de la acción inhibitora de los extractos de tejido nervioso sobre neuronas de langostino (Krnjević, 1997). Un año después se mostró que el GABA aplicado en forma directa a la corteza cerebral tenía efectos sobre la actividad eléctrica y se dieron evidencias de que involucraba el movimiento iónico en las neuronas (Krnjević, 1984; Houser et al., 1984). En 1966 se obtuvieron pruebas convincentes del carácter inhibitorio del GABA, al estudiar la placa neuromuscular del crustáceo (Kuffler et al., 1984).

Este neurotransmisor es un pequeño aminoácido monocarboxílico (100 daltones), su nombre proviene de las siglas en inglés de su estructura molecular: ácido (γ) gamma aminobutírico (4-aminobutirato, de acuerdo a su característica de aminoácido) y representa al principal neurotransmisor inhibitor del cerebro en los mamíferos (Olsen y Tobin, 1990; McKernan y Whithing, 1996; Avoli et al., 1997).

El GABA se produce en las terminales nerviosas por descarboxilación del glutamato, por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) también conocida como L-

glutamato-1-carboxilasa-liasa. La mayor parte del ácido glutámico necesario para la formación del GABA no proviene del torrente sanguíneo, la neurona posee un mecanismo enzimático de síntesis a partir de una transaminación oxidativa debida a la α -cetoglutarato transaminasa (GABA-T), o por un proceso de desaminación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa; por lo que de acuerdo a estos eventos metabólicos las fuentes del ácido glutámico son: 1) el α -cetoglutarico, metabolito del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ó 2) la desaminación de la glutamina (DeLorcy y Olsen, 1994; Deutch y Roth, 1999).

Un aspecto interesante en la síntesis del GABA es el que la enzima que provee al sustrato (glutamato) también lo degrada. El GABA es transformado a semialdehído succínico por la GABA-T en presencia de α -cetoglutarato como co-sustrato para la reacción. Así, la GABA-T es la clave de la síntesis y del catabolismo del GABA. Estos aspectos hacen diferente la síntesis del GABA a la de otros neurotransmisores, ya que el GABA es un derivado directo del metabolismo intermediario de la glucosa (Fig. 1; Paul, 1995).

La GAD es una enzima citosólica mientras que el glutamato es sintetizado en la mitocondria, por lo que es necesario un transporte o derivación del precursor de un compartimiento a otro para garantizar la producción de GABA. La GAD es crítica para el control de la excitabilidad neuronal, ya que la disminución de su actividad favorece la aparición de convulsiones (Tapia et al., 1975) y es blanco en el tratamiento de algunas epilepsias (Foster y Kemp, 2006; Wu et al., 2007). Esta enzima tiene como cofactor a un derivado de la vitamina B6, el fosfato de piridoxal (PLP; por sus siglas en inglés). La GAD está presente en las neuronas en dos formas, las cuales se encuentran codificadas por dos genes distintos. De acuerdo con su peso molecular las isoformas son distinguidas como GAD65 y GAD67. Estas enzimas exhiben algunas diferencias en su distribución molecular, lo que sugiere que estas dos formas de GAD pueden regular diferentes vías de síntesis de GABA. Estas GADs difieren significativamente en su afinidad por el PLP: la GAD65 muestra una alta afinidad al cofactor en tanto que la GAD67 posee una débil interacción con el PLP. La GAD65 es una enzima cuya actividad es rápida y eficientemente regulada. La GAD67 se regula a nivel transcripcional y su expresión depende de la excitabilidad de la neurona (Tapia y Sandoval, 1971; Covarrubias y Tapia, 1980). La GAD no esta presente en

neuronas en las que el ácido glutámico es utilizado como neurotransmisor, es decir, las neuronas glutamatérgicas no utilizan al GABA como neurotransmisor (Paul, 1995).

1.2 Recaptura del GABA

Estudios farmacológicos han mostrado que el GABA después de ser liberado por la terminal nerviosa es capturado nuevamente por las neuronas y por la glía. La recaptura depende del gradiente electroquímico del Na^+ , por lo que es dependiente de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Además, la glía tiene capacidad de almacenar GABA. La recaptura de GABA es el mecanismo primario de la inactivación de su efecto. El transportador es una proteína de doce pasos transmembrana, tiene sitios de glicosilación, y varios sitios para ser fosforilado: uno para proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) y siete para proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), por lo que el proceso de recaptura es modulado por la actividad de segundos mensajeros (Bowery, 1990; Nelson et al., 1990). Actualmente se distinguen tres distintos transportadores de GABA. Uno de ellos es expresado en forma específica por neuronas (SA1/2), otro lo expresan únicamente las células gliales (SN1) y el tercero es común para ambos tipos de célula (Fig. 1; Guastella et al., 1990; Liu et al., 1992).

Ante la estimulación eléctrica o química, se inicia una respuesta por parte de las neuronas. Entre los eventos que se suscitan, se puede identificar a las respuestas sinápticas excitatorias o en su defecto inhibitorias. Las primeras favorecen la propagación de los impulsos eléctricos ya sea por la liberación de neurotransmisores o por modificaciones en el nivel de receptores postsinápticos que potencien el efecto de los neurotransmisores. En tanto que los eventos sinápticos inhibitorios, pueden operar mediante dos mecanismos generales: por reducción en la liberación de aminoácidos excitadores a través de una acción pre-sináptica o por reducción de la excitabilidad de la célula post-sináptica (Kuriyama et al., 1993).

1.3 Fisiología de la neurotransmisión GABAérgica

El GABA tiene efectos en ambas membranas de la sinápsis (Krnjević, 1997). El efecto a nivel presináptico es una disminución del ingreso de calcio (Ca^{2+}) al botón terminal, debido a una activación del receptor GABA_B –el cual se describe a detalle en el punto 1.4 de esta tesis-. Debido a que el Ca^{2+} es un catión involucrado en la maquinaria de liberación

de neurotransmisores en la terminal nerviosa, el GABA en el componente presináptico genera una disminución en la liberación de neurotransmisores.

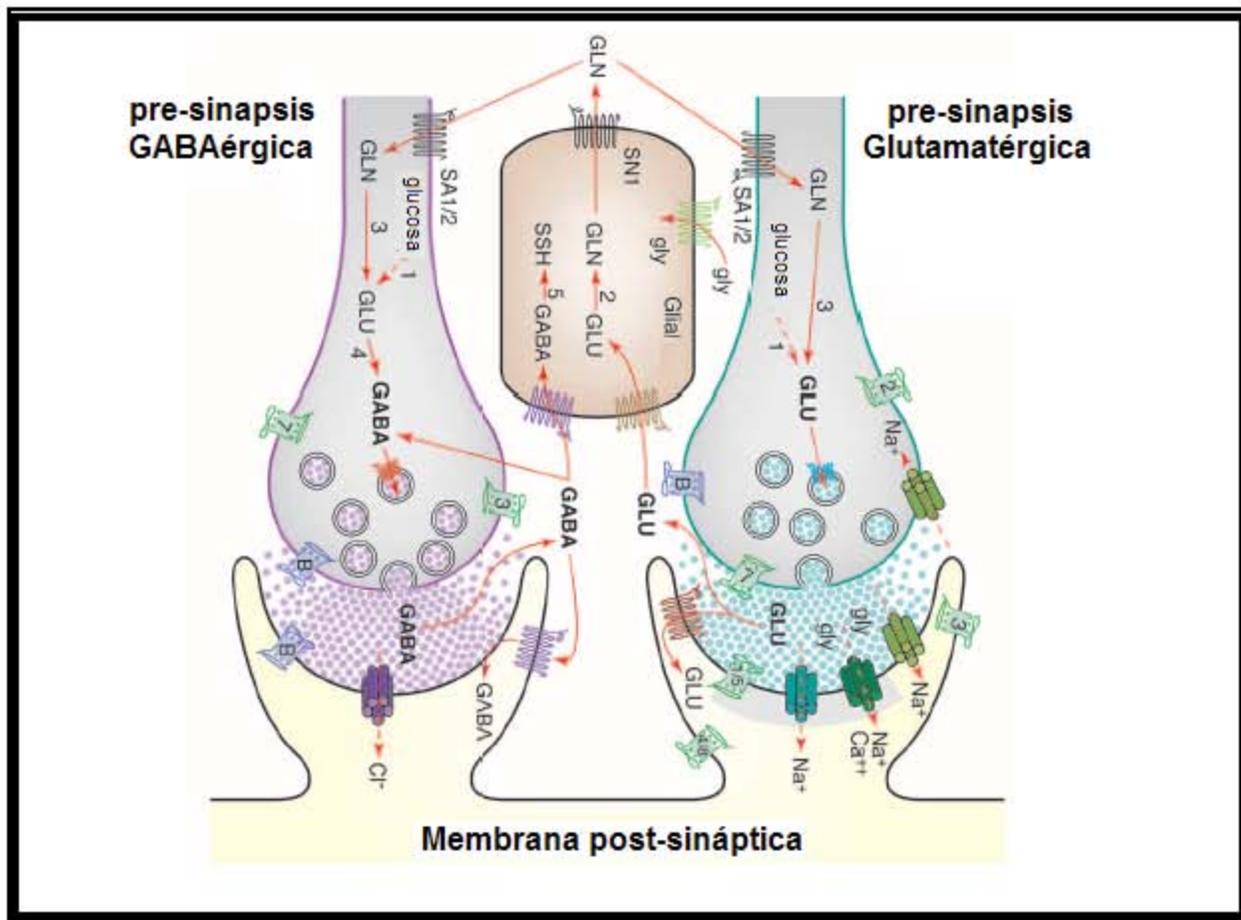


Figura 1. Diagrama bioquímico y fisiológico de las 2 neurotransmisiones más importantes en el SNC. A la izquierda, la dependiente del GABA. La glutamina (GLN) es capturada por la glia (al centro) por medio de su transportador específico (SN1) o en la terminal pre-sináptica por el SA1/2. La GLN es desaminada por la enzima glutaminasa para convertirse en glutamato (GLU, paso 3). El GLU también puede ser un metabolito intermedio de la oxidación de la glucosa (transaminación del α -cetoglutarato, paso1). El GLU se transforma en GABA por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, paso 4). El GABA puede interactuar con sus receptores pre y post-sinápticos y/o ser capturado por un transportador glial (GAT1-4) o neuronal. El GABA es catabolizado por la enzima succinato deshidrogenasa en succinato semialdehído (SSH; paso 5). El efecto de ésta neurotransmisión es inducir una disminución de la actividad neuronal. En contraste, a la derecha se distingue la neurotransmisión excitadora dependiente de GLU. Sus efectos se explican debido a que este neurotransmisor incrementa la conductancia de Na⁺ y Ca²⁺ generando una despolarización postsináptica (Modificado de Foster y Kemp, 2006).

A nivel post-sináptico, el mecanismo principal se debe a un rápido incremento en la conductancia al cloro (Cl⁻), lo cual tiene un efecto hiperpolarizante de la membrana neuronal. Además, en algunas neuronas se incrementa una conductancia lenta de potasio (K⁺) fortaleciendo la hiperpolarización. A todo el evento postsináptico se le denomina potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP por sus siglas en inglés; Borman, 1988;

Krnjević, 1991, 1997). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que durante la activación prolongada de los receptores de GABA en la dendrita, la respuesta de la membrana post-sináptica cambia de hiperpolarización a despolarización (Staley y Proctor, 1999). Una explicación para el cambio del efecto inhibitorio del GABA es la siguiente: el incremento del flujo de Cl^- y HCO_3^- a través del receptor ionotrópico tipo A para GABA (GABA_A) incrementa la concentración de estos aniones en el interior de la célula, por lo que disminuye su fuerza electroquímica y en consecuencia su flujo al interior de la neurona también disminuye. Además, al cambiar su potencial de equilibrio, se favorece un egreso del HCO_3^- , produciendo un evento despolarizante (Grover et al., 1993). Esta despolarización disminuye el bloqueo dependiente de voltaje del receptor NMDA (N-metil de Aspartato) por parte del ión magnesio, por lo que esta actividad mediada por GABA es suficiente para la activación sináptica del receptor NMDA (Staley et al., 1995). De tal forma, que las respuestas post-sinápticas GABAérgicas en neuronas corticales pueden consistir en una temprana “hiperpolarización somática” (también denominada respuesta h- GABA_A) y una respuesta “despolarizante dendrítica” (o respuesta d- GABA_A ; Bonnet y Bingmann, 1995). En conclusión, los flujos de HCO_3^- contribuyen a la respuesta d- GABA_A , en tanto que la respuesta h- GABA_A es principalmente debida a Cl^- (Perkins y Wong, 1997).

Los efectos del GABA a nivel pre y post-sináptico son consecuencia de su interacción en la membrana a través de proteínas receptoras. Los receptores para el GABA están divididos en dos grandes grupos, uno asociado a proteínas G y nucleótidos ciclados, denominado tipo B o GABA_B o de tipo metabotrópico. El otro es el ya mencionado GABA_A o de tipo ionotrópico. Un subgrupo de receptores GABA_A ha sido denominado GABA_C y se encuentra exclusivamente en retina.

1.4 El receptor GABA_B

El receptor GABA_B es una proteína de aproximadamente 80 kDa (Ohmori y Kuriyama, 1991) con siete pasos transmembrana. Es miembro de la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (específicamente G_i y G_o ; Soltesz et al., 1988; Kaupmann et al., 1997). Su agonista selectivo es baclofén, y el ácido 3-amino propil fosfonato; en tanto que los antagonistas selectivos de este receptor son el saclofén y el

faclofén (Kerr et al., 1987; Karlsson et al., 1988). El receptor GABA_B se encuentra en ambas membranas sinápticas: a nivel presináptico es el receptor que permite la disminución en la liberación de neurotransmisores por un bloqueo en el ingreso del Ca²⁺ a la terminal sináptica vía proteínas G, de tal forma que al ser activado inhibe la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Thompson y Gahwiler, 1992). En la región post-sináptica la activación de éste receptor induce el incremento en la conductancia a K⁺, lo que se identifica como la porción lenta del potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP, por sus siglas en inglés; Deutch y Roth, 1999).

1.5 El receptor GABA_A

El receptor GABA_A, tiene una composición semejante a los receptores ionotrópicos de acetilcolina (nicotínico) o de glicina y serotonina (5-HT₃). Estas proteínas están formadas por subunidades, por lo que las familias de estos receptores presumiblemente derivan de genes ancestrales. El receptor GABA_A es un complejo molecular integrado como heteropentámero de peso aproximado entre 275 a 400 kDa (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart et al., 1999).

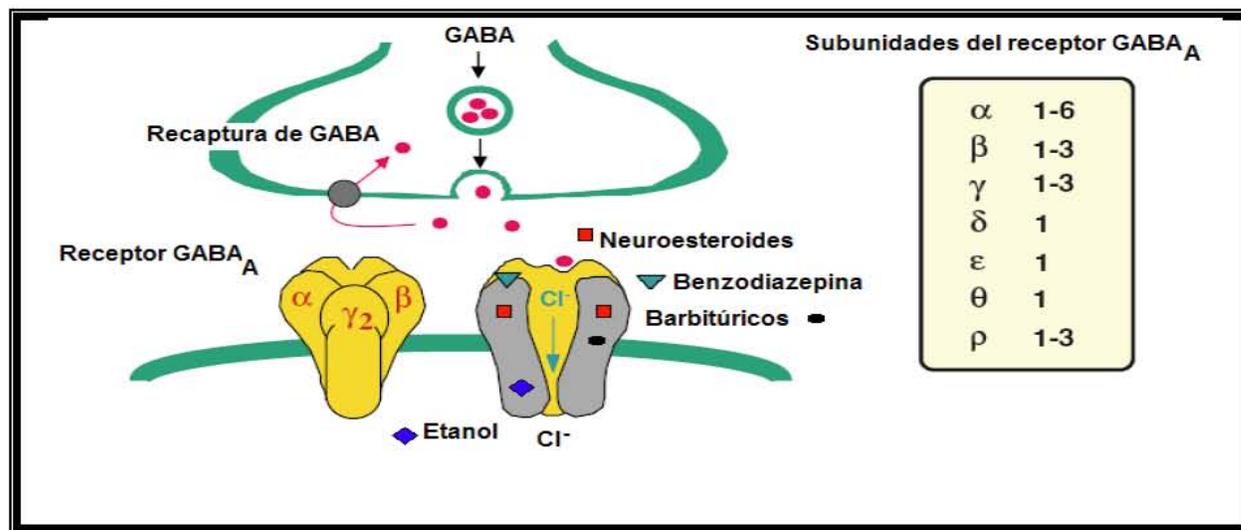


Figura 2. Representación del receptor GABA_A. Este receptor ionotrópico es un complejo proteico alostérico reconocido por diferentes ligandos y en sitios distintos. Al ser activado permite el ingreso de Cl⁻ a la célula, lo cual favorece un efecto hiperpolarizante. Su estructura es heteropentámerica, compuesta por 7 clases diferentes de subunidades, algunas cuentan con variables funcionales (Modificado de Mohler, 2006).

El estudio de la estructura molecular del receptor GABA_A ha permitido caracterizar a las subunidades que lo forman. Estas proteínas se denominan con las letras griegas: alfa (α),

beta (β), gamma (γ), delta (δ) epsilon (ϵ), rho (ρ) y theta (θ); además, es posible distinguir diversos tipos: 6 diferentes subtipos de α ; 3 distintas β , 3 tipos de γ , 1 forma de δ , 1 de tipo ϵ , 3 formas de ρ y un solo tipo de θ (Fig 2; Kardos, 1999; Chebib y Johnston, 1999). Cada subunidad tiene su dominio N-terminal del lado extracelular, el cual puede ser el sitio de ligado de varias moléculas.

Todas las subunidades presentan 4 dominios transmembranales denominados TM1, TM2, TM3, y TM4; la región TM2 representa un especial interés: su estructura de α -hélice permite la formación de un canal iónico. El afrontamiento de esta región con otras 3 ó 4 TM2 proporciona el revestimiento del canal. Localizado en la región del citosol cada TM tienen 2 anillos de residuos de aminoácidos, el anillo que conecta a las regiones TM3 con TM4 contienen residuos de serina, un excelente blanco susceptible de ser fosforilado. La secuencia de aminoácidos que componen a cada una de las subunidades del receptor GABA_A tiene una masa molecular en el rango de 48 a 64 kDa y además, muestra entre un 30 a 40% de identidad entre los distintos grupos de subunidades y un 70 a 80% de identidad entre subunidades del mismo grupo (Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996; Hevers y Luddens, 1998).

Basándose en esta heterogeneidad de isoformas, el ensamble variable de las subunidades otorga diversidad en las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor. A partir de esta variedad de subunidades se puede calcular una combinación de más de 10 000 isoformas posibles del receptor GABA_A, aunque no todas serían funcionales (Wafford et al., 1994; Araki et al., 1992; Wang et al., 1992; Zhang et al., 1992; Bovolin et al., 1992; Araki et al., 1992a y b).

El sitio de pegado del GABA a su receptor es a nivel de las subunidades α y β . Específicamente, en la subunidad $\alpha 1$ el residuo del aminoácido fenilalanina en la posición 64, es determinante para el pegado del neurotransmisor; en tanto que al nivel de la subunidad β los residuos de tirosina 157 y 205 así como las treoninas 160 y 302 son indispensables para el pegado del GABA. Cuando el neurotransmisor se une a su receptor ionotrópico los aniones pasan al interior de la neurona produciendo hiperpolarización o un cambio en el potencial de membrana, que lo aleja del umbral de disparo del potencial de acción. Este fenómeno se debe a un cambio conformacional de la proteína receptora que la convierte en un canal, el cual es significativamente largo (5-8 Å). La formación de un canal

selectivo en estas condiciones permite el flujo de Cl^- y aniones al interior de la célula. Esta selectividad proviene de la carga positiva de los aminoácidos que estratégicamente se encuentran en la porción final del canal.

El receptor-canal exhibe 3 diferentes conductancias las cuales se encuentran entre los 12, 17-20 y 27-30 pS; además se han revelado tres diferentes estados de apertura: 0.5, 2.6 y 7.6 ms (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996).

1.6 Modulación alostérica del receptor GABA_A

El receptor GABA_A es una proteína alostérica. Esto significa que sus propiedades de receptor pueden ser moduladas por la unión de otros compuestos que no se unen al mismo sitio que reconoce al GABA. Ciertos fármacos hacen más eficiente la transmisión GABAérgica, incrementando la frecuencia de apertura del receptor/canal o cambiando el tiempo de apertura del canal. Ejemplos de estos moduladores son los neuroesteroides, el alcohol, los barbitúricos y las Bzs, ya que estas moléculas se unen al receptor y potencian la actividad del GABA, por ejemplo, desplazan la función concentración-respuesta de GABA hacia a la izquierda (Hadingham et al., 1992; McKernan y Whiting, 1996). Específicamente, las Bzs son moduladores de las corrientes de Cl^- ya que incrementan la frecuencia de apertura del canal pero no la duración de los estados abiertos, en tanto que los barbitúricos alteran las características de las corrientes GABAérgicas incrementando la duración de las aperturas del canal. De tal forma que el resultado neto de la presencia de barbitúricos o Bzs o ambos es el incremento de la inhibición neuronal (Macdonald y Olsen, 1994; Kardos, 1999). Las Bzs tienen su sitio de pegado en el receptor al nivel de las subunidades α y β . Sin embargo, quien confiere la afinidad por las mismas es la subunidad γ , principalmente el subtipo tipo 2 (γ_2). El efecto alostérico de las Bzs es uno de los más estudiados. Una particularidad farmacológica más, es que para que el efecto de las Bzs se lleve a cabo, el GABA debe estar presente (Bureau y Olsen, 1990; Knapp et al., 1990).

El sitio de interacción de los barbitúricos se localiza en las subunidades α y β del receptor. Los barbitúricos tienen un modelo dual de acción: a concentraciones pequeñas su efecto depende de la presencia del GABA, sin embargo, a grandes concentraciones el efecto de incremento en el tiempo de la apertura del canal depende exclusivamente del barbitúrico.

La bicuculina (Bic), un potente convulsivante, disminuye el pegado del GABA al receptor de manera competitiva. Los antagonistas del receptor GABA_A mejor estudiados son el t-butilbiclofosforotionato (TBPS), y la penicilina, que bloquea el poro (Ruano et al., 1991; Costa, 1987; Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999). En tanto que agonistas selectivos de este receptor son la isoguvacina y el muscimol.

1.7 Distribución del receptor GABA_A en el SNC

Es conveniente hacer varias apreciaciones respecto al receptor GABA_A, su distribución en el cerebro y los efectos farmacológicos diferenciales que pueden obtenerse a partir de su interacción con sus ligandos. En esta dirección es posible identificar que una misma neurona es capaz de expresar diferentes tipos de receptor GABA_A y por lo tanto tener susceptibilidad farmacológica variable (García-Ugalde y Brailowsky, 1993).

Estudios farmacológicos previos dan evidencias de una segregación espacial de los receptores GABA_A y GABA_B postsinápticos en células piramidales. La respuesta postsináptica del receptor GABA_B es generada primariamente en dendritas, en tanto que la respuesta GABA_A se produce en el soma y las dendritas.

Exceptuando a las subunidades ρ que se expresan únicamente en la retina y las π que se encuentran en timo, pulmón, próstata y útero, las otras subunidades se expresan ampliamente en el cerebro. El receptor GABA_A de la retina es farmacológicamente insensible a Bic aunque es sensible a picrotoxina. Adicionalmente, este receptor no muestra modulación por barbitúricos, Bzs y baclofén por lo que se le denominó GABA_C (Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999). Los receptores GABA_C son derivados de la unión de varias isoformas de la subunidad ρ , capaces de formar el canal de Cl⁻. Los agonistas descritos para este subtipo de receptor son el ácido cis-4-amino crotónico o ACCA y el ácido trans-4-amino crotónico (TACA). En cuanto a los antagonistas del receptor GABA_C, el mejor estudiado es el ácido imidazol-4-acético y el ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-il-metil-fosfónico.

Estudios de biología molecular han permitido el mapeo de algunas subunidades del receptor GABA_A en el genoma humano. Por ejemplo, los genes que codifican a las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ se encuentran en el cromosoma 5 en las regiones q32-q33. En tanto que las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ se encuentran en el cromosoma 4 en las

porciones p13-4q11, en el caso de la subunidad $\alpha 5$, $\beta 3$ y $\gamma 3$ se encuentran en el cromosoma 15 en sus regiones q11-q13. La subunidad $\alpha 3$ se encuentra codificada en un gen que reside en el cromosoma X (Thompson et al., 1992; Wilcox et al., 1992).

No obstante que los ARNm (ácidos ribonucleicos mensajeros) que traducen para las subunidades del receptor GABA_A se encuentran en casi todo el cerebro, pueden distinguirse distribuciones heterogéneas en algunas regiones del SNC. Por ejemplo, las células granulares del cerebelo expresan casi exclusivamente la subunidad $\alpha 6$, en tanto que la subunidad $\alpha 1$ se expresa principalmente en neocorteza y cerebelo, dejando únicamente el 5% de todos los receptores GABA_A para la expresión de la $\alpha 5$ en hipocampo, corteza cerebral, amígdala y el bulbo olfatorio. En corteza cerebral son muy comunes las subunidades $\alpha 1-4$, al igual que la isoforma $\beta 2$, en tanto que las subunidades $\beta 1$ y 3 son más comunes en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el cerebelo. Por otra parte, las subunidades $\beta 4$ y $\gamma 4$ se han descrito solamente en el cerebro del pollo. Es interesante que la subunidad $\gamma 1$ se expresa predominantemente en la amígdala del lóbulo temporal y el septum, la variante $\gamma 2$ se encuentra prácticamente en todo el cerebro, y es muy común localizarla en presencia de $\beta 2$ y $\alpha 1$ (Essrich et al., 1998), la subunidad $\gamma 3$ esta presente en la corteza y el estriado. La triple combinación $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ conforma la población más frecuente del receptor GABA_A en corteza cerebral, en comparación con el hipocampo en donde es común la expresión de las subunidades $\alpha 2\beta 1\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 1\beta 3\gamma 2$ (McKernan y Whiting, 1996). La subunidad $\gamma 2$ tiene dos isoformas: larga ($\gamma 2L$) y corta ($\gamma 2S$; por sus siglas en inglés), la subunidad $\gamma 2S$ es más abundante que la $\gamma 2L$ en el hipocampo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio, en contraste en el colículo inferior, el bulbo y en el cerebelo se expresa más $\gamma 2L$ que $\gamma 2S$. La subunidad δ esta predominantemente en el cerebelo. En tanto que la subunidad ϵ esta presente en amígdala, tálamo y núcleos subtalámicos (Hevers y Luddens, 1998; Mehta y Ticku, 1999, Moler, 2006).

La coexpresión de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ asociadas con $\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$ con $\gamma 2$ integran a los receptores GABA_A en los que se cuantifica una mayor actividad de las Bzs. Se puede realizar una subdivisión farmacológica del receptor GABA_A en relación con el efecto y el pegado de las Bzs. El receptor tipo I (BZI), une con mayor afinidad a la trizolopiridazina (CI 218 872) en tanto que el receptor tipo II (BZII) une con gran afinidad

al 1,4 Bz: 2 oxo-quazepam. El receptor BZI abunda en cerebelo, en tanto que el BZII se encuentra en casi todo el cerebro. Para otro tipo de fármacos, como el TBPS el pegado al receptor estructurado con $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ es muy grande, en tanto que para algunos esteroides se ha identificado que la presencia de $\beta 2\gamma 2$ con cualquier isoforma de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ es importante para una modulación positiva más potente (Fritschy et al., 1992; Puia et al., 1993).

Diversos estudios indican que la fosforilación del receptor $GABA_A$ modifica las corrientes de Cl^- inducidas por GABA, Bzs y alcohol. La fosforilación puede incrementar (Stelzer et al., 1988; Browing et al., 1990) o disminuir estas corrientes (Leidenheimer et al., 1992; Leidenheimer y Chapell, 1997), modificando la cinética de activación y el proceso de desensibilización del receptor. Esta modulación por fosforilación depende de distintas enzimas derivadas de diversos segundos mensajeros como la PKA, la PKC y por la proteína Ca^{2+} calmodulina-cinasa. El blanco de estas fosforilaciones son los residuos de serina de las asas que comunican a M3 y M4 de las subunidades β (Fig. 2). De esta forma, la actividad de este receptor ionotrópico puede ser modulada por señales externas e internas (Lambert y Harrison, 1990; Krishek et al., 1994; Bureau y Laschet, 1995; Zhai et al., 1998; Churn y DeLorenzo, 1998).

Los cambios en la neurotransmisión GABAérgica tienen un papel preponderante en la fisiopatogénesis de diversos trastornos neuronales como la epilepsia, los síndromes de abstinencia, entre otros, estos transtornos tienen como característica principal el incremento de la excitabilidad neuronal, esta hiperexcitabilidad es consecuencia de alguno de los siguientes eventos que pueden surgir solos o asociados entre ellos: a) modificaciones en la síntesis del GABA, b) disminución en la liberación del GABA, c) cambios en la recaptura del GABA, d) modificaciones en la estructura del receptor, e) cambios en el número de receptores, y finalmente, f) cambios en la afinidad del receptor $GABA_A$. Estos eventos son los puntos de estudio de nuestro grupo de trabajo y sobre los cuales se basa parcialmente la hipótesis de esta tesis.

2.- Síndromes de Abstinencia relacionados con la neurotransmisión GABAérgica

A lo largo de la historia humana, las sociedades han consumido sustancias que alteran el estado de ánimo y el funcionamiento cognoscitivo, por ejemplo: el alcohol, la nicotina y la marihuana, entre muchas otras drogas. Además, en algunos casos, el progreso en el conocimiento farmacológico trae consigo nuevas drogas que propician modificaciones en el funcionamiento del SNC, como es el caso de los psicotrópicos. Diversos agentes neurofarmacológicos utilizados con un fin terapéutico pueden cambiar la conducta del paciente generando estados de tolerancia y dependencia física e intelectual.

2.1 Conceptos básicos: tolerancia y dependencia

La tolerancia puede ser definida como la reducción en los efectos de una droga después de ser administrada en forma repetida (Midel, 1981). Normalmente, conforme se aumenta la dosis de un fármaco, aumenta también su efecto observado. Sin embargo, después de dosis repetidas se requiere de dosis cada vez mayores para obtener el efecto logrado en la primera exposición (desviación a la derecha de la curva dosis-efecto). El diazepam (Dz) por ejemplo, produce de una manera característica sedación a dosis de 5 a 10 mg en el consumo por primera vez. Sin embargo, quien lo toma en forma repetida puede hacerse tolerante a dosis de hasta varios de cientos de gramo (Teuber et al., 1999).

Actualmente se distinguen diferentes tipos de tolerancia que pueden subclasificarse en tres: 1) tolerancia farmacocinética, 2) tolerancia farmacodinámica y 3) tolerancia aprendida. Está última incluye una forma de tolerancia conductual que también se llama tolerancia condicionada (Cox et al., 1983; Feldman et al., 1996).

El término de tolerancia farmacocinética o de eliminación, se refiere a los cambios de distribución o metabolismo del fármaco después de la administración repetida, de modo que hay concentraciones plasmáticas reducidas en la sangre y, de manera subsiguiente, en los sitios de acción de dicho fármaco. El mecanismo más frecuente es el aumento en la tasa metabólica de eliminación. Un ejemplo de este proceso es el de los barbitúricos, ya que estimulan la producción de enzimas microsomales en el hepatocito, con el consecuente retiro y catabolismo rápido de los barbitúricos de la circulación (McLellan et al., 1992).

La tolerancia farmacodinámica, funcional o de tipo celular, es la expresión del cambio en el número de receptores (*up/down regulation*) asociado o no a cambios en la afinidad del receptor por la droga (fosforilación-desfosforilación). También puede deberse a un desacoplamiento de las cadenas de señalización con el receptor (fosforilación, desfosforilación, cambios en el genoma, desensibilización; Feldman et al., 1996).

De manera adicional a los tres tipos básicos de tolerancia, la tolerancia aguda se refiere a aquella que se genera rápidamente tras el empleo de un fármaco en una sola ocasión. El ejemplo típico de este tipo de tolerancia es el producido por la administración de cocaína. Si se administra repetidamente, los efectos de dosis subsecuentes disminuyen en cuestión de horas y a lo largo de la misma sesión (Lader y File, 1987).

La tolerancia cruzada ocurre cuando el uso repetido de una sustancia confiere tolerancia no sólo a la sustancia que se está empleando, sino también a otras de la misma categoría estructural o mecánica, efecto que se observa entre las Bzs y los barbitúricos (Robinson et al., 1981).

En contraste con la tolerancia, la sensibilización es un incremento en la respuesta originado por la administración de la dosis repetida del fármaco. Este fenómeno se observa como una desviación hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta (O'Brien, 1996).

La dependencia es un término clínico que se refiere a un estado de adaptación (tolerancia) producido por el reajuste de los mecanismos homeostáticos ante la administración repetida de una sustancia. La droga puede afectar múltiples sistemas que antes estaban en equilibrio. La persona en estado de dependencia física o adaptada, requiere de una administración sostenida del fármaco para desempeñar sus actividades normales. Si en forma repentina, esta sustancia deja de administrarse, ocurrirá un desequilibrio brusco, y los sistemas afectados deberán someterse de nuevo a un proceso de reajuste hasta alcanzar un nuevo equilibrio sin la sustancia.

La prueba clínica de la dependencia física es la aparición del “síndrome de abstinencia” o síndrome de supresión cuando la droga ha dejado de administrarse. Las variables farmacocinéticas tienen importancia considerable en la amplitud y en la duración del síndrome de supresión. Cada categoría de sustancia conlleva síntomas característicos, que suelen ser contrarios a los efectos del fármaco (O'Brien, 1996).

Tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia son fenómenos biológicos que resultan como consecuencia natural del consumo y retiro de ciertos fármacos o sustancias. Estos fenómenos biológicos se pueden producir en animales de experimentación. Estos modelos pueden ser un correlato del evento que se registra en el humano. A continuación se mencionan las principales abstinencias que involucran al sistema GABAérgico y el enfoque actual que se les da en el campo de las neurociencias.

2.2 Abstinencia a Bzs y barbitúricos

Las Bzs se encuentran entre los fármacos con mayor frecuencia de prescripción en el mundo. Se utilizan especialmente para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio. Si se utilizan Bzs por algunas semanas ocurre poca tolerancia y la interrupción suele no causar muchos problemas. Sin embargo, después de varios meses aparece una tolerancia importante y se presenta síndrome de abstinencia si las dosis son disminuidas o se interrumpen. Es difícil distinguir entre los síntomas de la abstinencia y la reaparición de la ansiedad que motivó la prescripción de las Bzs. Es común el incremento paulatino de la dosis por la disminución del efecto durante tratamientos prolongados con Bzs. Los signos y síntomas más comunes de la abstinencia a las Bzs son la ansiedad y la agitación. Se incrementa la sensibilidad a la luz y al ruido, aparecen parestesias asociadas a sacudidas mioclónicas, se presentan trastornos del sueño y pueden mostrar mareos, inquietud e irritabilidad, así como una serie de signos neurológicos característicos, entre los que se incluyen: temblor, disartria, nistagmo y ataxia cerebelosa. Después de dosis altas de Bzs, el síndrome de abstinencia aparece con convulsiones y delirio (Doble y Martin, 1996).

En el caso de las Bzs la génesis de la dependencia física no es tan clara como con los barbitúricos u otros ansiolíticos como el meprobamato. Los efectos de los barbitúricos son similares a los observados con el alcohol. Dosis únicas de 200 a 400 mg de amobarbital producen en pocas horas disminución de la atención, disforia, distorsión en la sensación del tiempo, disminución en la actividad intelectual, nistagmo y diplopía. Altas dosis generan depresión respiratoria e hipoxia (O'Brien, 1996).

La privación de barbitúricos después de dosis repetidas induce cambios electroencefalográficos, tales como un incremento en la actividad basal, predominantemente en la región frontal del cerebro.

2.3 Abstinencia al alcohol

La abstinencia alcohólica se desencadena por un descenso absoluto o relativo de los valores de alcohol en sangre. Habitualmente aparece un temblor generalizado rápido, más perceptible en la lengua y las manos, que empeora con la actividad motora o situaciones estresantes, los síntomas alcanzan la plenitud a las 48 h del último consumo, el inicio puede ser brusco o gradual. Desde el punto de vista clínico, presenta unos pródromos caracterizados por temblor, alucinaciones visuales y ansiedad. El período de estado epiléptico constituye el llamado *delirium tremens*, caracterizado por un descenso del nivel de conciencia, actividad psicomotriz alterada, alucinaciones visuales y agitación psicomotriz. En el plano neurológico se muestra disartria, con temblores de grandes oscilaciones y síntomas de ataxia cerebelosa. Pueden presentarse crisis convulsivas acompañadas de confusión, desorientación, conciencia fluctuante y obnubilación. El cuadro alcanza su cenit a los 2-3 días de su inicio y puede mantenerse durante varios días. El riesgo de muerte es relativo pero en casos tratados la tasa de mortalidad es inferior al 1 % (Brailowsky y García, 1999).

El DSM-IV plantea los siguientes criterios comunes para el diagnóstico de la abstinencia de sedantes-hipnóticos y ansiolíticos: 1. Interrupción o reducción del uso abundante o moderado durante un período prolongado (varias semanas o más), de un sedante, hipnótico o ansiolítico seguida como mínimo, de tres de los siguientes síntomas: náuseas o vómitos, malestar general y/o debilidad, hiperactividad autónoma (p. ej. taquicardia, diaforesis, ansiedad o irritabilidad), hipotensión ortostática, temblor de manos, lengua y párpados, insomnio y crisis epilépticas. 2. Dichos síntomas no deben estar causados por ningún otro trastorno físico o mental.

Un denominador común de las abstinencias por drogas que involucran a la neurotransmisión GABAérgica es la hiperexcitabilidad del SNC. Pero, ¿cuáles son los posibles mecanismos responsables de la aparición de estos eventos clínicos?

2.4 Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia

El receptor GABA_A puede ser el origen de las alteraciones en los fenómenos de abstinencia, así como en algunos trastornos conductuales y en algunos tipos de epilepsia. La expresión del ARNm de las subunidades del receptor cambia debido a la excitabilidad neuronal, ya que después de crisis epilépticas disminuye la expresión de algunas subunidades como $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 4$ y $\gamma 1$ en las regiones donde se encuentra el foco epiléptico. Esto modifica la sensibilidad del receptor al GABA y a otros agonistas (Clark et al., 1994; Doble y Martin, 1996; Smith et al., 1998).

Trabajos previos señalan que los cambios en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ son fundamentales en la génesis de algunos tipos de epilepsias y en el inicio de las abstinencias a Bzs y neuroesteroides. Por ejemplo: los niveles de ARNm de esta subunidad se incrementan 4 h después de la primera crisis epiléptica inducida por kindling en la amígdala del lóbulo temporal (Clark et al., 1994). Crisis inducidas por ácido kaínico también muestran este fenómeno de *up-regulation* en la subunidad $\alpha 4$ (Tzunashima et al., 1997). Electrochoques repetidos también generan un incremento en la expresión del ARNm de esta subunidad (Clark, 1998). Además, durante la abstinencia a la alopregnanolona (aloP) y a la progesterona, aparece un incremento en la expresión de la isoforma $\alpha 4$. La terapia antisentido contra el ARNm de esta subunidad previene de la abstinencia a los neuroesteroides (Smith et al., 1998). Las abstinencias a Dz tienen en común el incremento en la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ en la corteza cerebral (Doble y Martin, 1996), en tanto que un tratamiento crónico con etanol induce una disminución en la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 6$ e induce un incremento de la $\gamma 3$ (Buck et al., 1991). Durante la abstinencia alcohólica se ha determinado también que las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 5$ disminuyen en su expresión en neuronas de corteza cerebral, además de que hay cambios en la fosforilación del receptor (Mhatre y Ticku, 1992). Diversos estudios indican que tratamientos largos con Bzs disminuyen significativamente la expresión de las isoformas $\alpha 1$ y $\gamma 2$. Cuando los tratamientos son prolongados (mayores de 1 mes), se presentan cambios en la subunidad $\alpha 5$, reduciéndose su expresión mientras hay un incremento en las isoformas $\alpha 3$ y $\alpha 6$ (Doble y Martin, 1996). En la abstinencia al Dz se ha cuantificado la

disminución en la densidad de las subunidades $\alpha 1$ y un incremento en la expresión de $\alpha 5$, $\gamma 2L$, $\gamma 2S$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en neuronas de la corteza cerebral, específicamente en la región frontoparietal (Impagnatiello et al., 1996; Pesold et al., 1997). Un tratamiento prolongado con muscimol en cultivos de neuronas, reduce la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 1$ (Hirouchi et al., 1992); el tratamiento simultáneo con Bic bloquea este fenómeno. Las β -carbolinas, antagonistas del receptor GABA_A, inducen un incremento en la expresión de la subunidad δ del receptor GABA_A en cultivos de neuronas (Doble y Martin, 1996).

Un aspecto interesante que sustenta la hipótesis de este trabajo es el siguiente: Hay una gran diversidad de drogas que reconocen al receptor GABA_A y el tratamiento prolongado con sus agonistas genera cambios en la expresión de sus subunidades. También puede haber cambios en el número de receptores, disminuyendo su número (*down regulation*) o incrementándolo (*up regulation*). Esto debe modificar la sensibilidad farmacológica, lo que determina cambios en la excitabilidad del tejido. Ahora bien, el agonista por excelencia del receptor GABA_A es el mismo GABA, por lo que es lógico proponer que estos cambios debe de producirlos el GABA.

El balance de las evidencias disponibles de los cambios en las subunidades del receptor GABA_A después de tratamientos prolongados con agonistas, provee de una explicación molecular del desarrollo de tolerancias y abstinencias a las drogas GABAérgicas. El GABA mismo debería producir algunos de estos cambios.

Existen ajustes rápidos ante la exposición prolongada de un agonista al receptor GABA_A, la desensibilización es la primera consecuencia. Ante una concentración grande de un agonista, el receptor disminuye su actividad. A largo plazo, este fenómeno también depende de un cambio en la composición de las subunidades del receptor (Cash et al., 1997). La desensibilización depende del estado de fosforilación del receptor. Así, un incremento en los niveles de AMP_C o en la actividad de la PKA, ya sea al mismo tiempo o por separado, inducen una disminución en la actividad del receptor favoreciendo la desensibilización. Es decir, la fosforilación cambia los estados de apertura, la duración de apertura del canal y/o la afinidad al pegado del ligando al receptor GABA_A (Frosch et al., 1992; Laidenheimer y Chapell, 1997; Brown et al., 1998).

2.5 El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)

En el curso de una investigación sobre la relación entre el GABA y la epilepsia (Silva-Barrat et al., 1988) en la década de los ochentas, se demostró un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo a la interrupción del tratamiento con GABA en el mandril fotosensible (Brailowsky et al., 1987; 1988).

En estos monos, la estimulación luminosa intermitente induce la aparición de descargas epilépticas al nivel de la corteza cerebral acompañadas de mioclonias generalizadas. Mediante cánulas intracorticales la infusión crónica localizada de GABA, fue capaz de provocar un potente efecto anticonvulsivo, el cual perduró a lo largo del periodo de infusión (7 días). En todos los monos, fotosensibles o no, en los que se administró el GABA, se constató la aparición de focos de actividad paroxística en el sitio de infusión al día siguiente de haber cesado el tratamiento. Independientemente del área infundida, la cánula de infusión (utilizada también como electrodo de registro) mostraba la presencia de poliespigas y de actividad en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora, se correlacionaba con la aparición de mioclonías de la pata posterior contralateral al hemisferio infundido. En algunos animales aparecieron sacudidas de “perro mojado” (Brailowsky et al., 1987; 1991).

Posteriormente se confirmó la presencia de este fenómeno de hiperexcitabilidad en la rata epiléptica (kindling amigdalino; Fukuda et al., 1987), y en la rata no epiléptica (Brailowsky et al., 1987; 1989). El fenómeno se caracterizó conductual y electroencefalográficamente (EEG; Brailowsky et al., 1988).

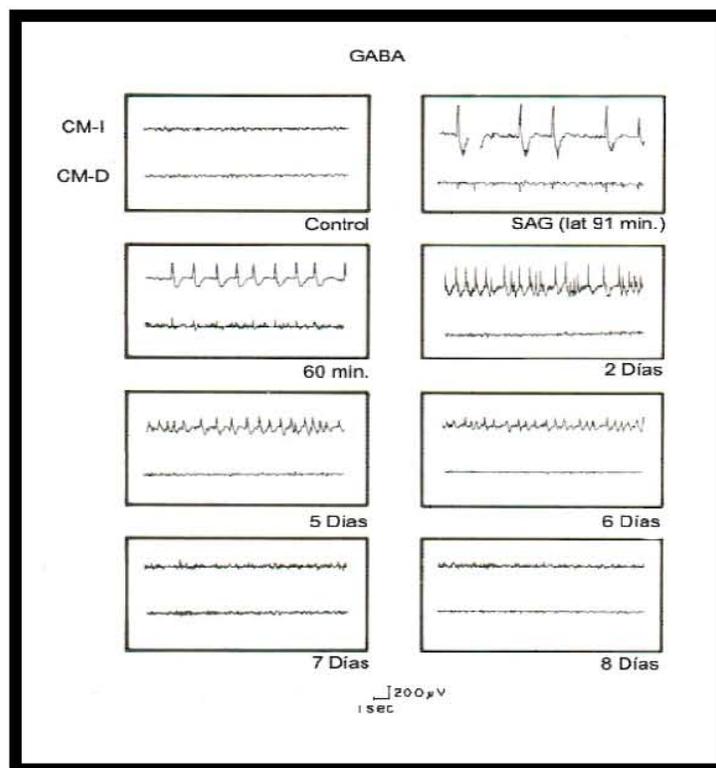


Figura 3. Electroencefalograma característico de un SAG en rata. La interrupción de la infusión de GABA en la corteza somatomotora izquierda (CM-I) induce una actividad espiga onda con latencia promedio de 90 min, duración de 7 días (tomado de Calixto E et al., 1995).

Tanto en monos como en ratas, la interrupción abrupta de la infusión intracortical crónica de GABA fue seguida de la aparición de un foco epiléptico localizado en la zona infundida y caracterizado por descargas en forma de espigas (Fig. 3). Al correr el tiempo, las manifestaciones electroencefalográficas se circunscribieron más a la zona de la cánula de infusión, y en las etapas finales del fenómeno, las descargas desaparecieron gradualmente para sólo reaparecer en la fase de sueño de ondas lentas.

A este fenómeno de hiperexcitabilidad se le llamó “Síndrome de Abstinencia al GABA” (SAG; LeGal La Salle et al., 1988; Silva-Barrat et al., 1992), pues aparte de las crisis convulsivas los animales mostraban otros signos clínicos tales como: mioclonus de la pata inferior contralateral al hemisferio infundido, movimiento incesante de las vibrisas, irritabilidad y aumento de la conducta exploratoria. Hay datos de dependencia física ya que la re-infusión de GABA hace que desaparezcan las manifestaciones EEG (Brailowsky, 1988). Finalmente, también hay datos de tolerancia cruzada a Bzs (Dz) y a barbitúricos

(pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modifica la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica en las primeras 24 h (Brailowsky, 1992).

Se han observado cambios metabólicos producidos por el SAG cortical con la técnica de la 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva (Brailowsky, 1991). Mediante esta técnica es posible estudiar el metabolismo glucídico cerebral ya que la 2-DG se acumula en el sitio de utilización. Así, las áreas cerebrales más activas acumularán más 2-DG, la cual puede ser visualizada mediante autorradiografía. De esta manera se observó un aumento significativo en el consumo local de glucosa (3 a 5 veces con relación al control) no solo del área cortical involucrada en la generación de la actividad paroxística, sino también en la zona talámica ipsilateral de proyección de dicha área cortical (*núcleos posterior oralis, ventro-postero-lateral, central lateral, ventro-lateral y reticular*) en animales sacrificados 60 min después de haberse iniciado el SAG. Estas regiones hipermetabólicas corresponden con las áreas de gliosis que se cuantifican en animales sacrificados 10 días después de interrumpirse la actividad paroxística (Brailowsky, 1991).

Las infusiones crónicas intracorticales del aminoácido impactan sobre la actividad de la GAD. Durante el SAG se manifiesta una reducción de aproximadamente 40% en la actividad de la GAD, tanto en ausencia como en presencia del cofactor, el PLP, a nivel del sitio de infusión con el aminoácido (Salazar et al., 1994).

A partir de rebanadas de corteza cerebral obtenidas de ratas que presentaban convulsiones *in vivo* (mioclonías unilaterales) o cambios eléctricos (espigas en el sitio de infusión), se realizaron experimentos *in vitro*, de los cuales se analizó, con registro intracelular, las neuronas situadas en la vecindad del sitio de infusión. La estimulación eléctrica de la sustancia blanca situada en el mismo plano columnar del sitio de registro indujo, en todas las células analizadas, despolarizaciones paroxísticas acompañadas de trenes de potenciales de acción de alta frecuencia. Estas modificaciones son denominadas despolarizaciones paroxísticas de gran amplitud o PDS (del inglés: paroxysmal depolarization shift) y se han considerado como una característica de las células epilépticas. En estas mismas rebanadas se observó la presencia de una población de neuronas que presentaban, además de las PDS inducidas sinápticamente, trenes de potenciales de acción de alta frecuencia provocados por la inyección intracelular de corriente. Estas neuronas, con capacidades intrínsecas para la generación de PDS se diferenciaron de las otras neuronas

(i.e. aquellas en las que las PDS solo podían ser producidas por estimulación sináptica) en: a) presentar potenciales voltaje-dependientes (que aumentaban por despolarización y disminuían por hiperpolarización), b) presentar PDS Ca^{2+} -dependientes: la sustitución del Ca^{2+} con cobalto produjo la desaparición de los trenes de potenciales de acción de alta frecuencia inducidos por corriente para dar paso a potenciales únicos, y c) una tolerancia a los efectos hiperpolarizantes del GABA aplicado al baño en el que se mantenía a las rebanadas. Esta tolerancia se manifestó con una DE_{50} (dosis efectiva 50) 50-100 veces mayor para estas células que para las neuronas con PDS sinápticas, usando la isoguvacina, agonista específico de los receptores GABA_A (Silva-Barrat et al., 1989; 1992; 2000).

Experimentos enfocados a determinar el papel de los dos principales subtipos de receptor al GABA: el GABA_A y el GABA_B , indicaron que el SAG es un fenómeno dependiente del primero. Las pruebas que apoyan esta afirmación son farmacológicas: por una parte, la demostración de que es posible inducir un foco epiléptico al interrumpir infusiones localizadas de isoguvacina, un agonista GABA_A específico y por la otra, la constatación de que los agonistas específicos del receptor GABA_B (baclofén) inducen dicho foco cuando se aplican; no cuando se retiran. Además, los antagonistas GABA_B , como el flaclofén, no tienen ningún efecto sobre focos epilépticos producidos por la privación de GABA (Brailowsky et al., 1990, 1991).

En estudios orientados a reproducir *in vitro* este fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal producido por la privación brusca del tratamiento crónico con GABA, se realizaron experimentos en rebanadas de hipocampo de rata (García-Ugalde et al., 1992). Esta es una preparación frecuentemente empleada en el estudio experimental de la epilepsia por la facilidad con la que se pueden reconocer sus elementos anatómicos (neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 y sus vías de llegada y salida). Por otra parte, dada la gran incidencia de epilepsia del lóbulo temporal (psicomotora), su estudio es de importancia clínica y experimental.

En rebanadas de hipocampo incubadas con GABA (10 mM) por 60 ó 120 min y luego privadas bruscamente del neurotransmisor, se constató la aparición de hiperexcitabilidad neuronal caracterizada por el aumento extraordinario de la respuesta de campo de las neuronas piramidales del área CA1 a la estimulación aferente (Fig 4; colaterales de

Schaffer), así como por la abolición de la inhibición recurrente mediada por el GABA evaluada mediante el paradigma de la estimulación pareada.

Estos experimentos demostraron la posibilidad de inducir un fenómeno de hiperexcitabilidad *in vitro* el cual puede ser un correlato del SAG *in vivo*. Las preparaciones *in vitro* pueden facilitar considerablemente el análisis neuroquímico y neurofarmacológico de la hiperexcitabilidad inducida por la privación de GABA, pudiendo realizar experimentos para resolver los eventos electrofisiológicos involucrados.

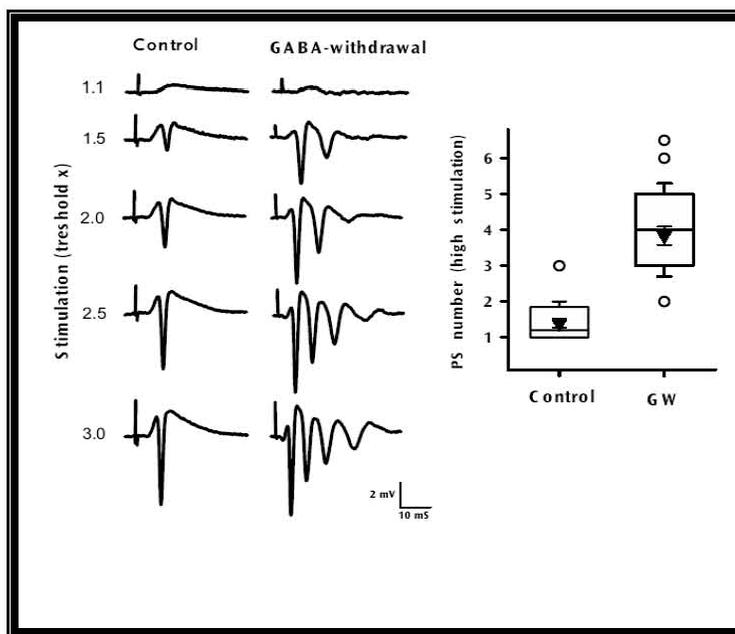


Figura 4. Hiperexcitabilidad neuronal inducida por la interrupción de la instilación de GABA *in vitro*. La actividad sináptica fue registrada en el área CA1 del hipocampo. Los registros de la espiga poblacional de la columna izquierda fueron obtenidos de rebanadas control en diferentes intensidades de estimulación (1.1 a 3.0 por arriba del valor umbral). En contraste, en condiciones de abstinencia a GABA, se aprecian descargas paroxísticas. La gráfica de cuadros indica las diferencias estadísticas en el número de espigas poblacionales evocadas por la estimulación. (Tomado de Casasola et al., 2004).

3.- Farmacología del Fnz

Un medicamento, es un compuesto que se utiliza para la prevención o control de enfermedades. Actualmente se ha hecho necesaria la prevención del consumo y abuso de algunas sustancias tanto ilegales, como legales. Es un asunto complejo, ya que el problema no es solo el fármaco, sino además quién convierte la droga en abuso.

La síntesis del primer barbitúrico se sitúa a 1863, en la actualidad más de 2,500 derivados de esta sustancia son utilizados en la medicina. En 1955, Sternbach sintetizó al clordiazepóxico, el patrón de acciones fue descrito por Randal (ver Martín, 1987). Pero fue

hasta 1961 cuando el clordiazepóxido fue introducido en la clínica marcando con ello el comienzo de la era de las Bzs. Hasta la fecha se han sintetizado más de 3000 compuestos benzodiazepínicos, de los cuales a 120 se les han probado su actividad biológica, y cerca de 35 se encuentran en uso clínico. La mayor parte de las Bzs que se encuentran en el mercado se han seleccionado por su alto potencial ansiolítico en proporción con su función depresora de la actividad del SNC (Mark y Waltzman, 1999).

Los barbitúricos y las Bzs, son los fármacos más utilizados en el mundo ya que son agentes terapéuticos que tienen capacidad de deprimir la actividad del SNC. Este fenómeno ocurre de manera dependiente de la dosis produciendo progresivamente sueño, pérdida del conocimiento, anestesia, coma, y por último depresión de la actividad respiratoria y cardíaca. Tratamientos prolongados con estos fármacos pueden llegar a generar serios problemas de salud ya que pueden provocar dependencia física y psíquica, así como tolerancia.

En 1887 se describieron los primeros cuadros de dependencias a tranquilizantes como el paraldehído, posteriormente a sustancias como el hidrato de cloral, los barbitúricos, el bromureído, el Dz, el meprobanato, la matacuolona, entre muchos otros fármacos más.

Las Bzs son fármacos que tienen un efecto selectivo sobre el receptor $GABA_A$, ejerciendo una modulación alostérica positiva. La unión entre las Bzs y el receptor $GABA_A$ tiene como resultado un incremento de las conductancias de Cl^- mediadas por el neurotransmisor sobre su receptor. Esta facilitación de las conductancias de Cl^- inducidas por GABA resulta en una hiperpolarización de las neuronas, permitiendo una disminución de la transmisión sináptica (Squires, 1983; Mark y Waltzman, 1999).

El Fnz es una Bz de rápida acción, semejante a otras Bzs, tiene un efecto selectivo en el receptor $GABA_A$, mediando procesos sinápticos inhibitorios en el cerebro, por ejemplo es 10 veces más potente que el Dz. La principal diferencia entre el Fnz y otras Bzs, radica en que el Fnz presenta alta afinidad por el receptor $GABA_A$ (Mattila y Larni, 1980; Woods y Winger 1997; Simmons y Cupp, 1998; Mark y Waltzman, 1999).

Clínicamente el Fnz tiene un efecto de sedativo, ansiolítico, anticonvulsivo, inductor del sueño, vasodilatador y depresor del ritmo respiratorio. En su estructura molecular el Fnz tiene un grupo nitro y un átomo de flúor, que lo hace diferente de las demás Bzs (Fig. 5;

Mattila y Larni, 1980; Woods y Winger, 1997; Simmons y Cupp, 1998; Mark y Waltzman, 1999).

El Fnz se sintetizó en 1970 por los laboratorios Roche y era usado hospitalariamente cuando se necesitaba una profunda sedación. Ingresó al mercado en Europa en 1975 y a partir de los años 80s, comenzó a estar disponible en otros países. Apareció en Estados Unidos en la década de los 90s.

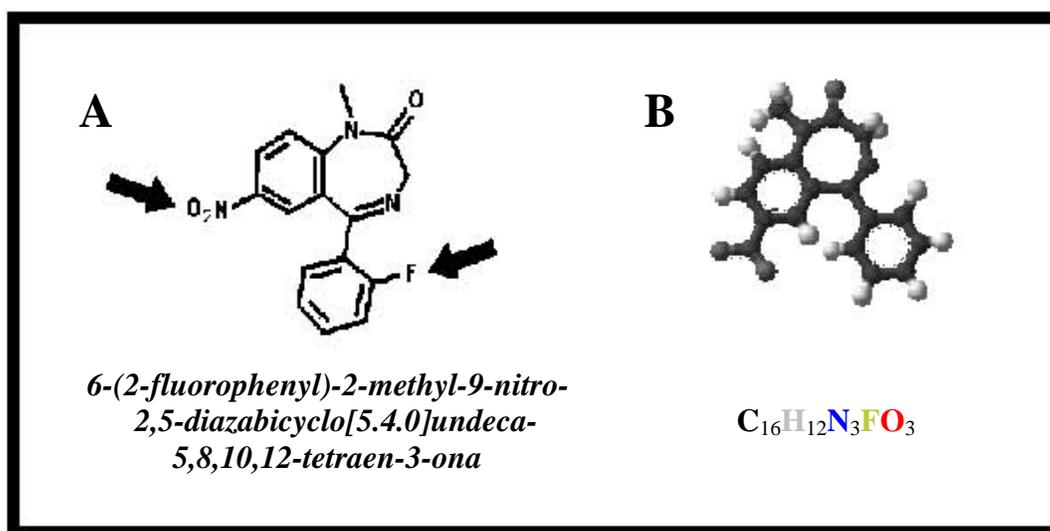


Figura 5. Estructura química del Fnz. En A se muestran los tres anillos básicos de la Bz: un anillo bencénico nitrado (N₂O), un anillo bencénico fluorado (F), marcados con flechas; un hexano nitrogenado con un grupo ceto. En B, el esqueleto de carbonos en forma tridimensional.

De acuerdo al criterio de la Convención de las Naciones Unidas sobre Sustancias Psicotrópicas (United Nations Convention on Psychotropic Substances), en 1995, después de 20 años de uso de Fnz, se le identificó un riesgo de abuso mayor que otras Bzs, motivo por el cual, la Organización Mundial de la Salud (OMS) cambió al Fnz del grupo IV al grupo III (el grupo III, denota una sustancia que tiene o presenta un riesgo de abuso considerable ó “un riesgo sustancial para la salud del público” (Woods y Winger, 1997).

El “*riesgo de abuso*” de un compuesto es la capacidad para producir una dependencia psicológica o fisiológica, en conjunto con la capacidad para alterar el comportamiento de una forma que es perjudicial al individuo o a su ambiente social (Woods y Winger, 1997).

En ese contexto, la misma característica por la cual el Fnz es una Bz con gran potencial clínico, es la misma que lo ha llevado a tener un alto riesgo de abuso. El Fnz produce una intoxicación semejante a la que induce el alcohol (Simmons y Cupp, 1998). El mal uso del Fnz en combinaciones con diferentes sustancias psicotrópicas (marihuana, alcohol, heroína o cocaína), tiene como consecuencia la aparición de síndromes de abstinencia, o intoxicaciones. Por tanto, aunque el Fnz puede llegar a presentar abstinencia y tolerancia en periodos cortos de administración durante uso clínico, es sin duda alguna la automedicación y el uso en combinación con otras drogas, lo que genera el mayor porcentaje de abstinencias o problemas (Mattila y Larni, 1980; Woods y Winger, 1997; Simmons y Cupp, 1998).

Por su acción como hipnótico y amnésico (McKay y Dundee, encontraron que 1mg de Fnz causa amnesia en el 65 % de los pacientes que lo ingieren) es considerado como una droga ideal para incapacitar víctimas, el Fnz es insípido, inodoro y soluble en agua y alcohol (Woods y Winger, 1997; Mark y Waltzman, 1999).

Desde su aparición e introducción en el mercado, el Fnz ha ido incrementando su grado de consumo en diferentes partes del mundo, teniendo el mayor porcentaje en Europa, Asia y América, encontrándose entre el 40% y 68% del total de las Bzs consumidas en los diferentes países (Woods y Winger, 1997; Mark y Waltzman, 1999).

3.1 Farmacodinámica y farmacocinética del Fnz

La característica típica del Fnz en el sistema cardiovascular es su efecto de vasodilatación periférica, esto causado por el relajamiento de la pared vascular de las arterias.

El Fnz es empleado especialmente en el campo de la anestesiología, se absorbe casi completamente (80 al 90 %) por el tracto gastrointestinal, se une en un 80% a proteínas plasmáticas, esta conducta farmacocinética se puede ilustrar con un modelo de tres compartimentos. Tiene una rápida redistribución del compartimento central (plasma) (Bond y colaboradores mostraron un rápido incremento de los niveles en plasma de Fnz (5 min) después de haber sido administrada de manera intranasal) a compartimentos tisulares explicando la discrepancia entre la vida media de la droga y la duración de sus efectos clínicos, debido a que su vida media es aproximadamente de 20 h.

El Fnz se metaboliza casi completamente en el hígado. Hay varios metabolitos (el que resulta de su reducción, 7-amino derivado; por hidroxilación, los 3-hidroxi derivados y por desmetilación, los N-desmetil derivados; algunos de estos metabolitos intermedios son activos, el más importante es el 7-amino derivado. El Fnz se metaboliza a través de una N-desalquilación o hidroxilación por el sistema microsomal del hígado, seguido de la conjugación con ácido glucorónico. La vía de excreción del metabolito inactivo es del 90% mediante la orina y solo el 10 % por el tubo digestivo (Mark y Waltzman, 1999).

3.2 El síndrome de abstinencia a Fnz

El síndrome de abstinencia a Fnz, es semejante al generado por otras Bz, presentándose siempre al retiro abrupto de una administración crónica (puede comenzar de 2 a 10 días después de la cesación de la sustancia (Lander, 1994). Este síndrome de abstinencia es caracterizado por la aparición de: ansiedad, irritabilidad, inestabilidad emocional, temblor, insomnio, náuseas, dolor de cabeza, vértigo, falta de coordinación motora, hipersensibilidad sensorial, disforia, letargo, fatiga, visión borrosa, sensación facial ardiente y dolor muscular (Lander, 1994; Petursson y Lander, 1984; Mark y Waltzman, 1999).

Lo anterior se resume en un problema de salud, que ha generado la búsqueda de una estrategia farmacológica para contrarrestar la mayoría de los riesgos y problemas ocasionados por el uso y abuso del Fnz, así como de otras sustancias con actividad GABAérgica.

Se sabe que el retiro abrupto de la administración de Fnz en humanos altera la actividad cortical registrada a través del EEG. Los cambios en el EEG se caracterizan por la disminución de las ondas de baja frecuencia durante el sueño paradójico y el no paradójico. A diferencia de otras Bzs que presentan largos periodos de efectos residuales, el Fnz presenta un periodo corto de efecto residual (Tan et al., 2003). Dentro de la práctica clínica, el Fnz es utilizado como auxiliar en el tratamiento para el Síndrome de Abstinencia al Alcohol (SAA) en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Diversos estudios clínicos (Spies 1996, 2003), concluyen que el Fnz se perfila como un fármaco de primera elección para utilizarse en casos de SAA, debido a que disminuye su severidad y duración, así como de los requerimientos médicos, además de disminuir la incidencia de neumonía y acorta la estancia en las UCI. Dentro del mismo ámbito clínico, el Fnz es utilizado como inductor el

sueño en dosis de 1 y 2 mg, las cuales han demostrado ser más efectivas que otras Bzs utilizadas con el mismo fin (Woods y Winger, 1997).

Estudios *in vivo*, indican que el efecto de las Bzs disminuye la actividad registrada durante el EEG en diferentes estructuras del cerebro (hipocampo, corteza, entre otras), en diversos modelos animales: gatos, ratones, monos, conejos, ratas, perros (Depoortere et al., 1983). Estudios *in vitro* muestran un correlato del síndrome de abstinencia, ya que existe un incremento en la actividad sináptica de la corteza cerebral, después del retiro abrupto del Fnz (Calixto et al., 2000).

III Justificación de la realización de esta tesis

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México en el año 2003, los trastornos del uso de sustancias en nuestro país son comunes, cercanos al 10 % del total de la población, siendo los más frecuentes el abuso del alcohol y las sustancias psicotrópicas de características GABAérgicas. Es alarmante que la prevalencia del uso de estas sustancias en la región centro sur este del país es del 36 %. Estas estadísticas epidemiológicas señalan a las abstinencias por psicotrópicos GABAérgicos como un problema potencial de salud. Este proyecto pretende generar una estrategia farmacológica que sea el sustento terapéutico para un mejor tratamiento de las mismas.

Antecedentes a este proyecto señalan cambios cuantitativos de la expresión de subunidades (*down y up regulation*) como consecuencia de las abstinencias de Bzs, neuroesteroides y el alcohol, sin embargo, desconocemos si la abstinencia de GABA genera los mismos cambios de expresión de subunidades en el receptor.

¿Los resultados de esta tesis puede tener impacto en la clínica? la respuesta es afirmativa. Específicamente, puede y debe repercutir en el apartado de los conceptos básicos relacionados al manejo farmacológico de las abstinencias en pacientes. Investigaciones previas indican que es posible disminuir o bloquear las manifestaciones clínicas y moleculares de las abstinencias mediante la aplicación conjunta de la droga que genera la abstinencia con otro agonista del receptor GABA_A, esta segunda droga debe cumplir con el requisito de aplicarse a una concentración menor a las que por separado genera un efecto y/o su administración debe ser por periodos breves. En el caso de confirmar esta premisa, contamos con la estrategia electrofisiológica para cuantificar de una

forma estructurada y complementaria, el efecto esperado: bloquear la génesis, el mantenimiento y las manifestaciones de la hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia a GABA. Proponemos con esto dar un sólido apoyo a la toma de decisiones farmacológicas en la clínica y una base cuantitativa para futuras investigaciones clínicas o epidemiológicas.

Finalmente, la justificación de utilizar las drogas para este trabajo se argumentan a continuación. En el apartado de las Bzs se utilizará el Fnz, debido a una premisa clínica: es el psicotrópico GABAérgico más utilizado en forma intra hospitalaria por diferentes instituciones de salud y genera condiciones de abstinencia a muy cortos periodos de exposición.

IV Objetivo

Evaluar el efecto de la exposición previa del agonista GABAérgico Fnz, sobre la generación de la abstinencia inducida por GABA a través de la técnica electrofisiológica de registro del potencial postsináptico excitatorio de campo en el área CA1 en rebanadas de hipocampo de la rata.

V Planteamiento del problema

En el ámbito de las neurociencias y la clínica neurológica, son recientes los hallazgos que relacionan una disminución de los datos clínicos de las abstinencias con drogas GABAérgicas, utilizando estrategias farmacológicas de exposición. Por ejemplo, la administración conjunta de alcohol y ácido γ hidroxibutírico (GHB) revierte el incremento de expresión de la subunidad $\alpha 4$, un marcador selectivo de abstinencias dependiente del receptor GABA_A (Follesa et al., 2004). La exposición de 48 h del neuroesteroide aloP a neuronas de hipocampo en cultivo, favorece el incremento de la expresión de la subunidad $\alpha 4$, este proceso se ve bloqueado por la administración corta de alcohol a bajas concentraciones, las cuales por si solas no inducen abstinencia (Smith y Gong, 2004). Por otra parte, se tiene identificado que la administración de Dz en etapas iniciales de la ingesta de alcohol reduce los cambios en las subunidades del receptor GABA_A que induce la abstinencia inducida por el alcohol, aspecto que no puede resarcir el baclofén (Sanna et al., 2003). De la misma manera, el pre-tratamiento con Dz y GHB bloquean por separado el

efecto de *up regulation* de la subunidad $\alpha 4$ inducida por la abstinencia al alcohol (Follesa et al., 2003). La administración conjunta de alcohol y de aloP disminuye la tolerancia y dependencia farmacológica en roedores (Morrow et al., 2001). La administración previa o la co-administración de progesterona, aloP y el sulfato de pregnenolona con Dz o triazolam reducen la tolerancia, ansiedad e hiperactividad cuantificada por las Bzs (Reddy y Kulkarni, 1997).

La lectura global de estas evidencias permite elaborar una hipótesis relacionada a la posibilidad de bloquear o disminuir la abstinencia que induce una droga GABAérgica mediante la aplicación de otra que ocupa el mismo receptor. El factor reductor de la abstinencia de la segunda droga se basa en: a) la administración en secuencia (previa o en paralelo a la que genera la abstinencia, pero por periodos cortos) o b) la concentración sea pequeña.

VI Hipótesis

Tomando en cuenta los hallazgos previos, proponemos como hipótesis general que las modificaciones de la neurotransmisión GABAérgica previas a un proceso de abstinencia (por ejemplo, un pequeño incremento en su tonicidad) disminuye la aparición y el mantenimiento de las condiciones de hiperexcitabilidad. Esta estrategia permitirá tener una idea global del posible sustrato de prevenirlas o reducirlas.

VII Material y Métodos

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar (110-130 g) provenientes del bioterio del INPRF (mantenidas en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25° C), alimento (*ad libitum*) y bajo un ciclo de luz oscuridad invertido (12 x 12 h; de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, Academia Nacional de Medicina, 1999).

Bajo anestesia con pentobarbital sodico (50 mg/Kg de peso; Anestosal®), los animales fueron perfundidos con un catéter a nivel del ventrículo izquierdo del corazón con una solución a base de sacarosa a temperatura de 4 °C, (composición en mM: sacarosa 229, KCl 2.0, glucosa 10, Na₂HCO₃ 26, Na₂HP0₄ 1.2 y MgCl₂ 1.5), burbujeada con una mezcla 95% O₂/ 5% CO₂ para mantener un pH constante de 7.4.

Al término de la perfusión, el cerebro fue extraído rápidamente. Cada hemisferio se seccionó en un vibratomo (pelco 101) en cortes sagitales de 400 μm de grosor a temperatura de 4 °C. Las rebanadas se mantuvieron en una solución salina semejante en composición al líquido cerebro espinal (concentración en mM): NaCl 125, KCl 2.0, MgCl₂ 6.0, CaCl₂ 1.0, NaHCO₃ 25, glucosa 11, NaHCO₃ 26, en burbujeo continuo con la mezcla de gases (95% O₂ / 5% CO₂) ajustado a un pH de 7.4 con una osmolaridad de 300 mOsmol/l.

Para el registro de la actividad electrofisiológica, cada rebanada fue colocada en una cámara de perfusión continua (2.5 ml), a temperatura ambiente y con una velocidad de superfusión de 2 ml/min. La solución de registro estándar contenía (concentración mM) NaCl 125, KCl 3.0, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, glucosa 11, NaHCO₃ 26, en burbujeo continuo con (95% O₂ / 5% CO₂) y pH de 7.4.

Los protocolos farmacológicos y los registros de los potenciales postsinápticos excitatorios dendríticos (fEPSP, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo en el área CA1 del hipocampo (*stratum radiatum*) por medio de micropipetas de vidrio llenas con solución de NaCl al 0.9% (2-3 MΩ; Fig.6; amplificador Axoclamp 2B, axon instrument). Los fEPSPs fueron observados en un osciloscopio y digitalizados simultáneamente para su almacenamiento (pClamp V9.2 de Axoclamp Instruments) en computadora. Los estímulos para provocar los fEPSPs se realizaron con un electrodo bipolar concéntrico en las

colaterales de Shaffer mediante pulsos cuadrados únicos (0.40-10 μ s a 0.2Hz; estimulador Grass S-11, unidad de aislamiento Grass PSI U6), así como con pulsos pareados: 10 a 60 ms en intervalos de 10 ms. La intensidad de estimulación para todos los experimentos fue la necesaria para obtener un fEPSP con una amplitud del 50-60% de la amplitud máxima. Estos protocolos no indujeron depresión o espigas múltiples, ni potenciaron la respuesta en las condiciones control o testigo.

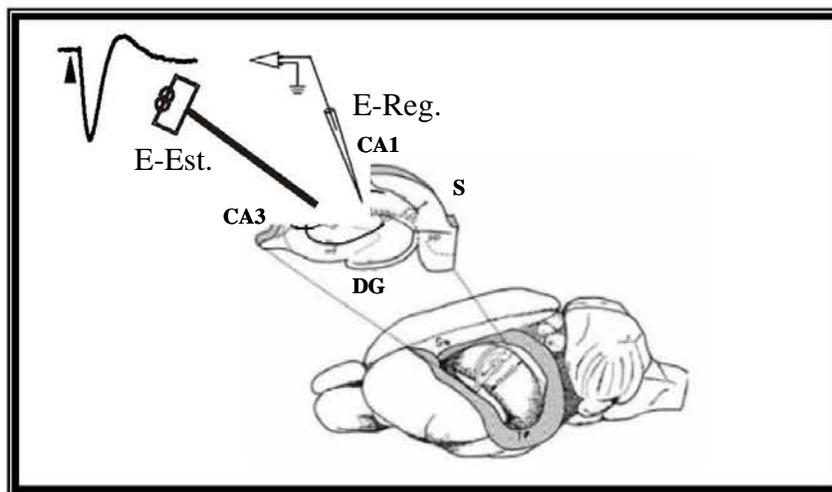


Figura 6. Esquema del SNC y localización anatómica del hipocampo de rata. El hipocampo está estructurado en una conexión trisináptica: la información de la corteza cerebral ingresa al hipocampo a través de la vía perforante (PP) haciendo sinapsis en el giro dentado (DG), cuyas células envían sus axones al área CA3, formando con ello las fibras musgosas (mf). Los axones de las neuronas de CA3 hacen sinapsis en el área CA1, su proyección es a través de las colaterales de Shaffer (sobre las cuáles en nuestra preparación de rebanada, se inyectaron los estímulos cuadrados con un electrodo bipolar (E-Est). La actividad sináptica de CA1 (fEPSP, inserto del ángulo superior izquierdo) fue registrada por un electrodo de registro (E-Reg) conectado a un amplificador de señales bioeléctricas. CA1 proyecta su información nuevamente a la corteza cerebral a través del subiculum (S).

Se formaron 8 grupos de trabajo, realizando un diseño experimental de la siguiente forma:

- 1) Grupo control (n=9).
- 2) Grupo en el que se indujo la hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA (n=23; GABA 5 mM/2h).
- 3) Grupo que verificó el efecto electrofarmacológico del Fnz (n=7; 60 μ M/60 min).
- 4) Grupo que recibió el pre-tratamiento con Fnz previo a la exposición de GABA(n=16).
- 5) Grupo en el que se verificó el efecto de la Bic (20 μ M), en condiciones control (n=6).
- 6) Grupo que en condiciones de abstinencia a GABA fue expuesto a Bic (n=5).
- 7) Grupo en el que pre-tratamiento con Fnz bloqueó la abstinencia de GABA y se

cuantificó el efecto de Bic (n=6).

- 8) Grupo en el que pre-tratamiento con Fnz bloqueó la abstinencia de GABA y se cuantificó el efecto del incremento de la concentración de K^+ extracelular (10 mM; n=6).

Los experimentos para inducir hiperexcitabilidad por privación de GABA se realizaron de la siguiente manera: después de haber determinado las condiciones estables de los fEPSPs (línea base 10-40 min) las rebanadas se incubaron con GABA (5 mM) durante 120 min. Después se retiró el GABA de la superfusión y el registro de la actividad sináptica se continuó por 4 h (grupo 2). En otro grupo de rebanadas, corroboramos que el Fnz no indujo abstinencia, ya que el retiro de su corta exposición no generó hiperexcitabilidad (grupo 3). Sin embargo, la exposición previa de la Bz a la de GABA, si bloqueó la generación de la abstinencia al aminoácido (grupo 4). Debido a que fue necesario identificar la sensibilidad farmacológica del sistema GABAérgico del tejido, realizamos un grupo en el que cuantificamos el efecto de la Bic en condiciones control (grupo 5), para compararlo con los grupos 6 y 7. La justificación de haber realizado el grupo 6 obedece a lo siguiente: la máxima hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA puede corroborarse después de 2.5 h del retiro del neurotransmisor, el objetivo principal de estudio de este grupo fue cuantificar la sensibilidad farmacológica para la Bic en estas nuevas condiciones de hiperexcitabilidad, sin embargo, para evitar un efecto de saturación (*ceiling*) en la amplitud de la respuesta, la intensidad del estímulo fue re-ajustada (disminuida) para obtener una respuesta semejante a la amplitud del fEPSP inicial (50-60% de la amplitud máxima). El grupo 7 fue realizado para comprobar que el Fnz es capaz de bloquear la hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA, preservando la sensibilidad farmacológica de la neurotransmisión GABAérgica. Por esta razón, después de identificar que la amplitud de los fEPSPs regresaron a valores de la línea base (4 h) la preparación fue expuesta a Bic. Finalmente, el propósito de realizar el grupo 8, tuvo la siguiente justificación: debido a que el bloqueo de la hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA que llevó a cabo el Fnz se debía a una posible muerte neuronal que obedecía al tiempo prolongado del experimento, fue necesario determinar si el tejido tenía adecuadas condiciones excitables, por lo que, a las 4 h después del retiro de GABA, la rebanada fue expuesta a un incremento de K^+ extracelular para inducir un efecto despolarizante e identificar el incremento en la amplitud del fEPSP.

Para el análisis de cada experimento (control, hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA, aplicación y pre-tratamiento con Fnz), a todos los grupos se normalizó al 100% el valor de amplitud promedio de los fEPSPs de los 15-30 min iniciales de cada experimento o línea base (tiempo en el que se corroboró una amplitud estable y sin modificaciones mayores al 20% de la amplitud; todas aquellas respuestas con incrementos o disminución de la amplitud del fEPSP en este porcentaje, fueron eliminadas). Para evaluar el efecto de la Bic (control, hiperexcitabilidad y pre-tratamiento con Fnz), se normalizó al 100% el promedio de la amplitud antes de la aplicación del antagonista (15-20 min previos a la exposición de Bic). El análisis estadístico se llevó a cabo validando la diferencia entre los promedios normalizados de la amplitud de los fEPSPs \pm su error estándar, identificando el porcentaje de cambio en esta amplitud en el curso temporal de los experimentos. Utilizando la prueba t de student (pareada y no pareada, según el caso) y la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney, dando una significancia al valor de $P \leq 0.05$.

Las drogas y sales utilizadas en este trabajo fueron adquiridas a Sigma-Aldrich (St. Lois, MO. USA), exceptuando a la sacarosa y glucosa de laboratorios Hycel de México; CaCl_2 de laboratorios JT-Baker de México, el NaH_2PO_4 de Merck (Alemania) y el Fnz que fue comprado directamente a los laboratorios Roche de México.

VIII Resultados

1A. Efectos de la abstinencia al GABA en el área CA1 del hipocampo.

La frecuencia (0.01 Hz) y la intensidad (50-60% de la respuesta máxima) del protocolo de estimulación que evocó los fEPSP no indujeron cambios significativos en la morfología y en la amplitud de la respuesta sináptica en un periodo de 3 h (Fig. 7, $P < 0.5$). A diferencia de los trabajos previos de García-Ugalde (1992) y Casasola (2004), en los que se registró la espiga poblacional (EP) del *stratum-piramidale* de CA1, el presente trabajo de tesis se realizó en el *stratum-radiatum*, lo que explica la diferencia en la morfología y la cinética lenta de la respuesta sináptica. La amplitud promedio de los fEPSPs en condiciones control fue de 1.0 ± 0.02 mV ($n=9$).

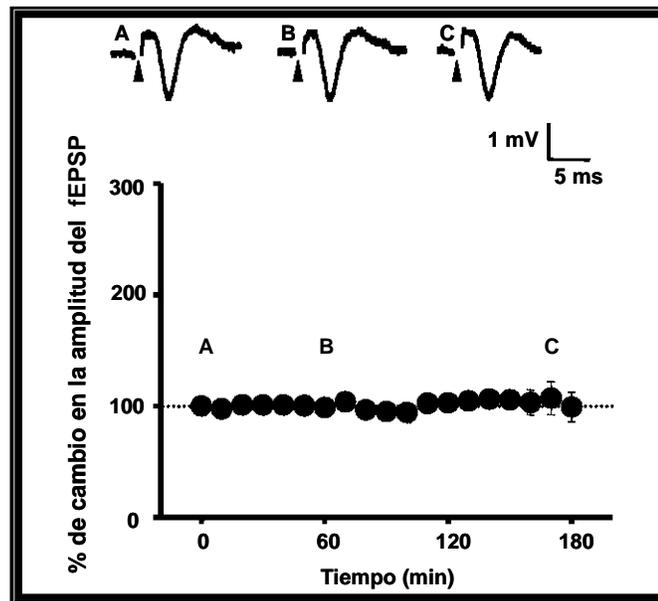


Figura 7. Curso temporal control de los fEPSP en la región CA1 del hipocampo durante 3 h. La actividad sináptica fue constante y no se modificó por el protocolo de estimulación. Los insertos superiores muestran las morfologías de los fEPSPs representativos obtenidos a los (A) 15, (B) 60 y (C) 180 min. El artefacto de estimulación fue eliminado en todos los registros de la presente tesis y fue sustituido por triángulos.

La siguiente serie de experimentos estuvo encaminada a inducir la hiperexcitabilidad del área CA1 del hipocampo por la interrupción de la administración de GABA. En este grupo de rebanadas, la administración de GABA (5 mM) por 120 min indujo la rápida disminución en la amplitud de los fEPSPs (44 ± 5 %; efecto máximo a las 1.5 h de incubación), este efecto se mantuvo durante la exposición del aminoácido (Fig. 8B; $n=23$). El retiro abrupto de GABA de la superfusión, permitió el aumento gradual de la amplitud

de los fEPSPs, inicialmente hasta recuperar el valor de la línea base (30 min después de la interrupción de GABA), consecutivamente lo sobrepasa y finalmente, generó un incremento significativo en el voltaje de la respuesta sináptica a partir de los 45 min del término de la superfusión del neurotransmisor. Una secuencia temporal por hora del incremento en la amplitud de la actividad sináptica, puede resumirse de la siguiente forma: $165 \pm 19\%$ a los 60 min, $232 \pm 29\%$ a los 120 min; y de $258 \pm 21\%$ a las 3 h (Fig. 8), todos los tiempos indican el término de la infusión de GABA.

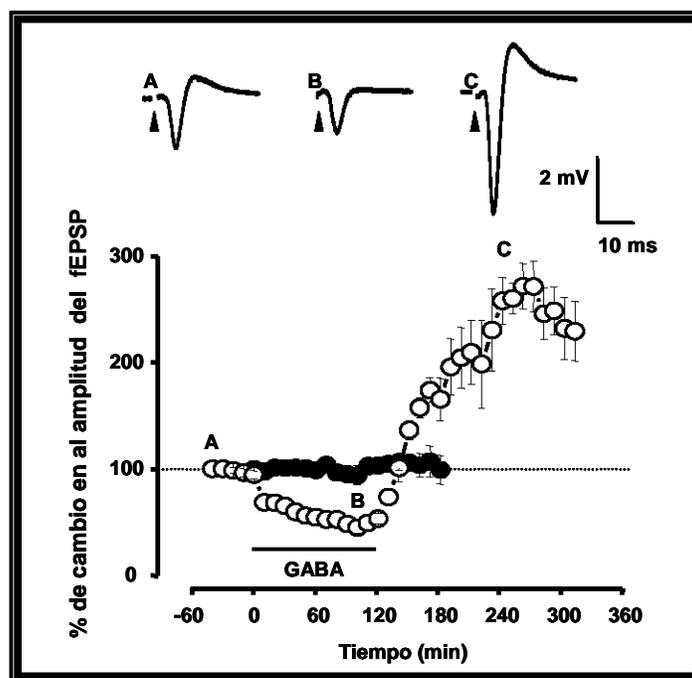


Figura 8. Inducción de la hiperexcitabilidad en el área CA1 del hipocampo por abstinencia a GABA. La exposición del aminoácido (5 mM) durante 120 min (línea horizontal) induce primero una disminución en el voltaje del fEPSP y posterior a su retiro, un incremento significativo de la amplitud de los fEPSP (círculos blancos, $n=23$). Comparado con el grupo control (círculos negros; $n=9$) se puede observar que la exposición y el retiro de GABA es el responsable de este incremento de la excitabilidad neuronal. Los registros representativos superiores muestran la secuencia de los fEPSPs en diferentes condiciones: (A) control, (B) 100 min de exposición a GABA y (C) 2 h de abstinencia a GABA. El tiempo cero indica el tiempo de inicio de la incubación de GABA.

Estos resultados muestran la factibilidad de inducción de la hiperexcitabilidad por la abstinencia a GABA *in vitro* en nuestro laboratorio. Queda de manifiesto que este incremento en la excitabilidad neuronal es estable y que sobre el mismo puede estudiarse la actividad del sistema GABAérgico y la posibilidad de estudiar la susceptibilidad farmacológica durante un estado de hiperexcitabilidad. Esto fue lo que motivó los experimentos que se refieren a continuación.

1B. Cambios en la neurotransmisión inhibitoria durante la hiperexcitabilidad inducida por la abstinencia al GABA.

El hipocampo de los mamíferos es una estructura privilegiada del SNC, debido a que en condiciones normales el ingreso de la información excitatoria en el área CA1 va asociado a un fuerte control de interneuronas GABAérgicas que impide descargas epilépticas, la activación de circuitos reverberantes y el reclutamiento asincrónico de poblaciones neuronales (Traub y Jefferys, 1994). Esta propiedad excitable del hipocampo es identificable experimentalmente mediante el protocolo de estimulación por pulsos pareados.

En condiciones control, como se observa en la figura 9A-B, la inducción de dos fEPSPs en un periodo corto entre ellos (10-40 ms) genera que la amplitud del segundo fEPSP sea menor comparada con la primera; esto se debe a que en paralelo a la estimulación sináptica excitatoria, se estimula a una interneurona recurrente, la cual es inhibitoria. Esta neurona libera GABA, y ante una alta frecuencia de estimulación, condiciona una mayor concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico, lo que genera una paradoja fisiológica importante: una alta frecuencia de estimulación y períodos de estimulación cortos favorecen la disminución de la excitabilidad.

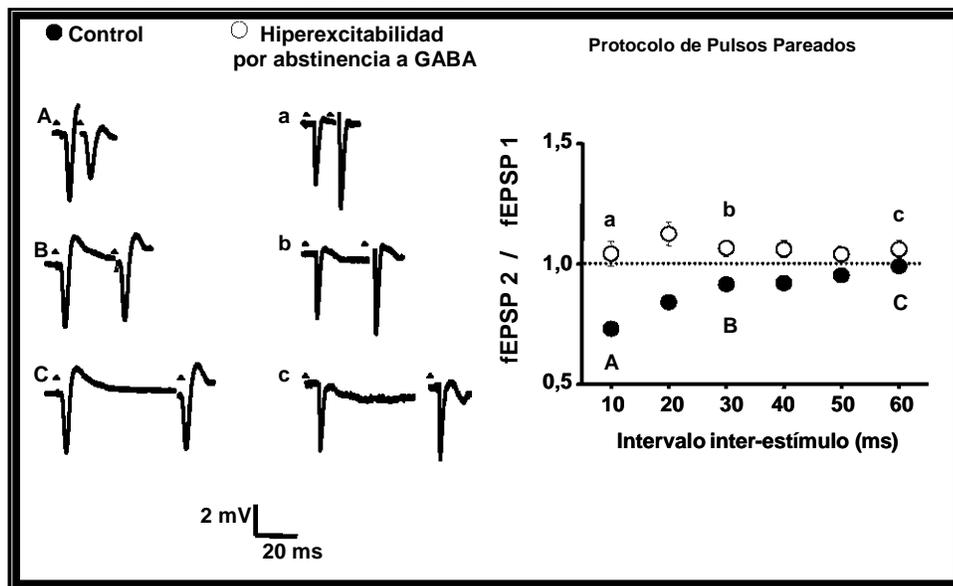


Figura 9. Pérdida de la inhibición recurrente del área CA1 del hipocampo por la abstinencia a GABA *in vitro*. A la izquierda, se muestran fEPSPs de un experimento característico en el que la abstinencia a GABA induce la aparición de una facilitación sináptica. En el panel derecho, el gráfico matemático del protocolo de estimulación por pulsos pareados en los que se indujo dos fEPSPs separados a intervalos de 10 a 60 ms, el cociente de la amplitud del segundo fEPSP entre la del primer fEPSP brinda una relación de inhibición (condiciones control; círculos negros; n=37) o facilitación (condiciones de abstinencia a GABA, círculos blancos, n=15).

En resumen, la actividad de la interneurona en el hipocampo representa un sistema de protección a las neuronas piramidales impidiéndoles despolarizaciones por largos periodos. Esta inhibición se reduce si el intervalo inter-estímulo es igual o mayor de 50 ms (Fig. 9C).

La pérdida de la inhibición recurrente es un correlato común de las epilepsias y/o en condiciones experimentales farmacológicas en las que el receptor GABA_A es bloqueado por un antagonista específico, como la Bic (Creager et al., 1980).

Nuestros siguientes experimentos fueron orientados a identificar los cambios en la inhibición recurrente del área CA1 del hipocampo por la abstinencia al GABA; 2.5 h, después de interrumpir la exposición a GABA, tiempo en el que fue identificada la máxima hiperexcitabilidad, nuevamente se realizó la evaluación de la respuesta a través del protocolo de pulsos pareados. En estas nuevas condiciones de excitabilidad, la inhibición recurrente es remplazada por un incremento significativo de la amplitud del segundo fEPSP (facilitación por pulsos pareados) a intervalos inter-estímulos cortos (Fig. 9a-c; círculos blancos; $P < 0.002$). Constatando con ello la falla GABAérgica previamente demostrada por García-Ugalde y colaboradores (1992) y Casasola y colaboradores (2004).

1C. Modificaciones de la relación de voltaje (amplitud)/intensidad (estimulación) en condiciones de hiperexcitabilidad.

Los fEPSPs de los registros anteriores fueron generados siempre por el mismo rango de intensidad de estimulación (50-60% de la respuesta máxima), duración del estímulo (0.40-10 μ s) y frecuencia (0.1-0.2 Hz). Sin embargo, un estudio básico de electrofisiología debe demostrar que la amplitud de la respuesta sináptica es dependiente de la intensidad de la estimulación. Por lo tanto, nuestros siguientes experimentos fueron orientados a demostrar que la amplitud de los fEPSPs fue proporcional a la intensidad de la estimulación. Considerando que en condiciones de hiperexcitabilidad por la abstinencia de GABA, la pérdida de la inhibición recurrente indica un déficit del control GABAérgico, nosotros proponemos que esta relación voltaje (amplitud del fEPSP)/ intensidad del estímulo, debe ser mayor durante la abstinencia a GABA.

En condiciones control, la curva amplitud del fEPSP/intensidad de estimulación guarda proporcionalidad (Fig. 10, círculos negros). La intensidad del estímulo se normalizó al valor inicial de umbral de inducción del fEPSP, por lo que la cantidad mínima para generar

la respuesta sináptica se definió como valor umbral ó 1x. Cuando la intensidad de estimulación fue 8 veces el valor umbral (8x), el porcentaje de incremento de la amplitud del fEPSP fue de $214 \pm 12\%$ (n=5). La adición de GABA (5mM) a la superfusión cambia la proporcionalidad de la relación amplitud/intensidad (Fig.10, cuadrados), la respuesta inicial disminuyó ($50 \pm 6\%$), a un valor de estimulación 8x, también la amplitud del fEPSP fue reducida, comparado con el mismo valor de la curva control, en estas condiciones la amplitud de la respuesta sólo alcanzo un incremento del $128 \pm 33\%$ (n=6). Estos resultados indican que el GABA disminuye la excitabilidad neuronal generando un corrimiento de la curva amplitud/intensidad a la derecha. En contraste, el incremento de la excitabilidad por la abstinencia a GABA corre la curva amplitud/intensidad a la izquierda (n=10), aduciendo con ello que existe un mayor número de neuronas sincronizadas en su disparo y despolarización; en estas condiciones, el valor umbral tiene inicialmente un incremento en la amplitud del fEPSP de $199 \pm 15\%$ y su cambio a un valor de estimulación 8x induce un incremento en la amplitud del fEPSP de $376 \pm 18\%$ (Fig.10, círculos blancos).

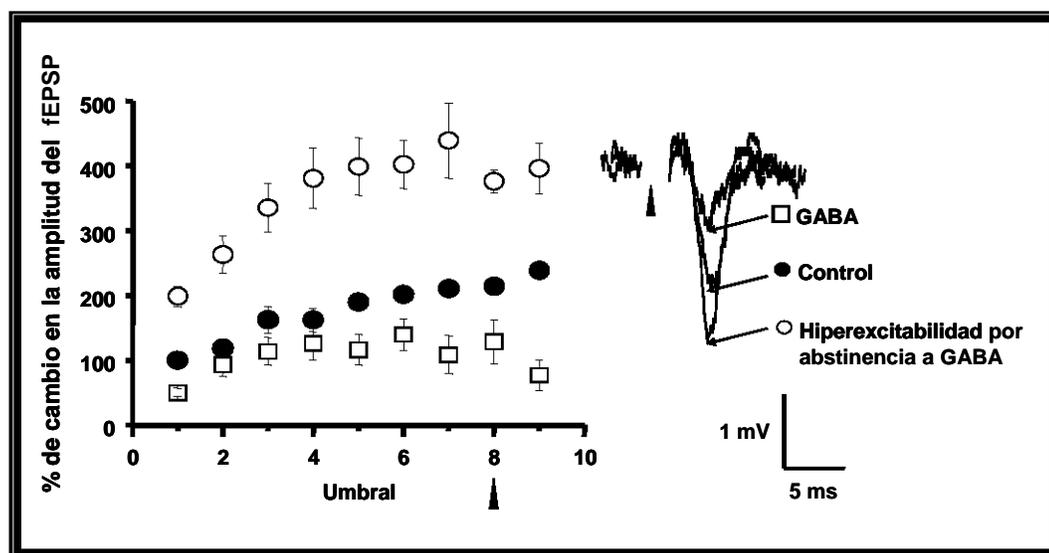


Figura 10. Modificación de la relación amplitud del fEPSP/ intensidad de la estimulación, durante condiciones de incremento y disminución de la neurotransmisión GABAérgica. El incremento en la amplitud del fEPSP control (círculos negros, n=5) guarda una proporción lineal del valor umbral (valores normalizados a la intensidad mínima para generar un fEPSP) hasta 9 veces este valor-umbral. La adición de GABA (5 mM; cuadros, n=6) reduce esta relación. En contraste, durante la condición de hiperexcitabilidad inducida por la abstinencia de GABA (círculos blancos, n=10), provoca un corrimiento de la curva a la izquierda, es decir, se manifiesta un incremento de la relación amplitud/intensidad. En el recuadro derecho, un registro de un fEPSP en las tres condiciones descritas previamente tomado a un valor de estimulación 8 veces mayor al umbral (triángulo negro).

En resumen, los resultados previos indican: 1) la hiperexcitabilidad neuronal por la abstinencia a GABA *in vitro* genera una disminución de la inhibición recurrente, 2) aumenta la probabilidad de reclutamiento de neuronas en proceso de despolarización y 3) esta hiperexcitabilidad se mantiene constante hasta por 3 h después de la interrupción de GABA y no es consecuencia de la frecuencia e intensidad de la estimulación.

2. Efectos del Fnz sobre la neurotransmisión GABAérgica del hipocampo.

Trabajos previos de nuestra línea de investigación (Calixto et al., 2000) muestran que la concentración de Fnz (60 μ M) durante 120 min, induce hiperexcitabilidad en la corteza cerebral después de interrumpir su exposición. La exposición de esta misma concentración durante 60 min, no provoca cambios en la amplitud de la espiga poblacional en la misma neocorteza.

Con el propósito de identificar el efecto electro-farmacológico del Fnz en el área CA1 del hipocampo, se utilizó la misma concentración de Fnz que produjo los efectos previamente reportados en la corteza cerebral.

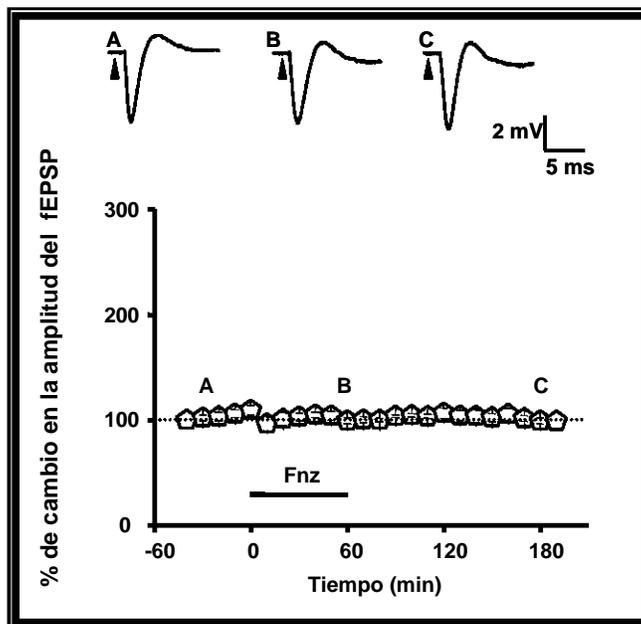


Figura 11. La exposición de Fnz (60 μ M) por 1 h (barra horizontal) no induce cambios en la amplitud de los fEPSPs del área CA1 del hipocampo. Los fEPSPs superiores fueron registrados: A) antes, B) durante la superfusión de la Bz y C) 120 min después de su interrupción. El tiempo cero indica el inicio de la exposición.

El curso temporal de la exposición de Fnz (60 μ M; por 60 min) se muestra en la Fig.11. A diferencia del efecto reductor en la amplitud del fEPSP del GABA en el hipocampo y de

Fnz en corteza cerebral, la amplitud de los fEPSPs en esta área del hipocampo se mantiene sin modificaciones durante la superfusión de Fnz (Fig. 11B) y 2 h después del término de la exposición (Fig. 11C, n=5).

Comparándolo con el grupo control (Fig. 12; círculos negros, n=6), el protocolo de estimulación por pulsos pareados no mostró cambios significativos en la inhibición recurrente durante la aplicación de Fnz (Fig. 12; pentágonos blancos, n=4) y tampoco a las 2 h, después de haber interrumpido su exposición (Fig. 12; triángulos invertidos, n=5). La curva-amplitud fEPSP/ intensidad de estimulación, tampoco identificó cambios del Fnz en relación a las condiciones control (datos no mostrados).

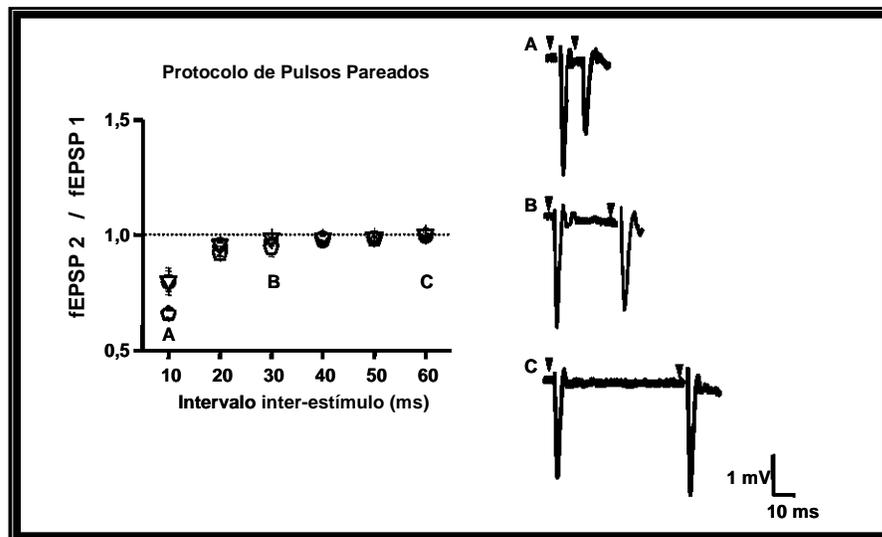


Figura 12. La inhibición recurrente del área CA1 del hipocampo es refractaria al efecto de Fnz. La gráfica izquierda muestra la relación inhibitoria entre los fEPSPs intervalos inter-estímulos pequeños (< 30 ms). Los registros durante la exposición de Fnz (pentágonos blancos) y 2h, después de la exposición con la Bz (triángulos invertidos) son semejantes a las condiciones control (círculos negros). Los fEPSPs de la derecha muestran diferentes intervalos (A) 10, (B) 30 y (C) 60 ms.

En síntesis, con respecto a los experimentos de incubación de Fnz, la Bz no induce cambios: 1) en la amplitud de los fEPSPs y asimismo, 2) en la inhibición recurrente y 3) en la curva amplitud/intensidad.

3. La incubación previa de Fnz bloquea la hiperexcitabilidad inducida por la interrupción de la exposición del GABA.

La justificación de realizar la siguiente serie de experimentos se basa en la posibilidad de aminorar las manifestaciones clínicas de algunas abstinencias por drogas GABAérgicas mediante la aplicación conjunta y/o previa de otro agonista del receptor GABA_A. La droga que bloquea la hiperexcitabilidad debe cumplir con al menos uno de los siguientes requisitos: aplicarse a una concentración menor a las que por separado genera un efecto de abstinencia o que su administración debe ser por periodos breves.

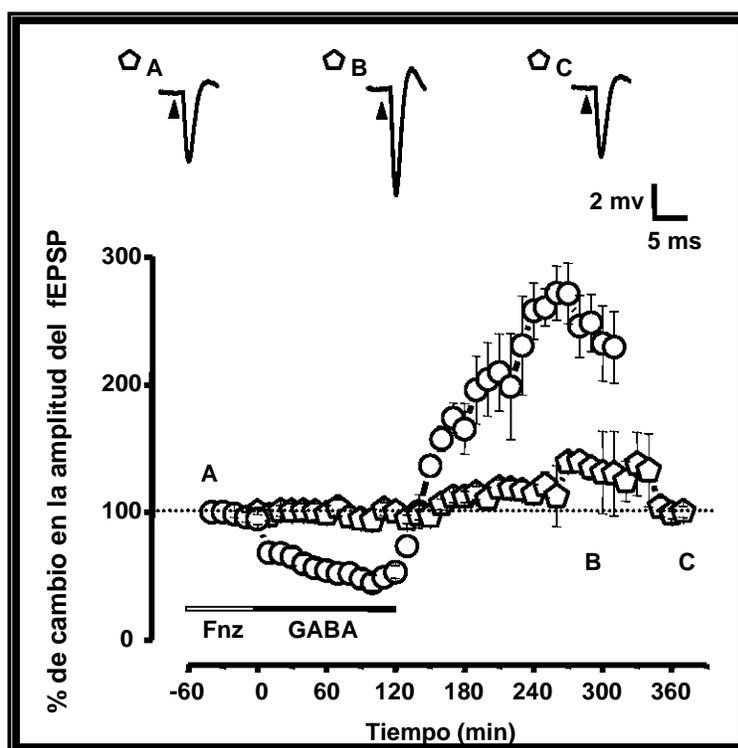


Figura 13. Una pre-exposición breve de Fnz bloquea la hiperexcitabilidad inducida por la abstinencia a GABA. La exposición por 60 min de Fnz (60 μ M; barra horizontal blanca) previa a una exposición de GABA (5 mM; barra horizontal negra) por 120 min, induce una hiperexcitabilidad que gradualmente disminuye y regresa a valores de la línea base, 4 h después de la interrupción de la instilación del aminoácido (pentágonos; n=16). En contraste, la interrupción abrupta de la exposición de GABA por 120 min, sin pre-tratamiento de Fnz, desencadena un incremento significativo en la amplitud de los fEPSPs, (círculos blancos, n=23; $P < 0.001$ medido a 2.5 h de abstinencia). Los registros superiores son representativos de los fEPSPs que coinciden con tres puntos de la evolución temporal del experimento con pretratamiento de Fnz: (A) control; (B) 2.8 h, y (C) 4 h, después del interrumpir la infusión de GABA, respectivamente. El valor de tiempo cero indica el inicio de la incubación con GABA.

En función de lo anterior, los datos previos del efecto del Fnz (60 μ M; 60 min) cumplen esta condición (Fig. 11 y 12). De esta manera, cuando la exposición del Fnz (Fig. 13, barra blanca) precede a la incubación de GABA (Fig 13; barra negra, 5 mM/120 min) la

interrupción de la infusión de GABA genera sólo un incremento transitorio en la amplitud de los fEPSPs; los valores de la amplitud de los fEPSPs no muestran diferencia significativa 230 min después del término de la infusión de GABA con los valores control (Fig.13; pentágonos blancos, n=16; $P < 0.4$); estos resultados contrastan con el grupo de la exposición de GABA, en el que la interrupción del aminoácido genera un incremento permanente y significativo en la amplitud de los fEPSPs a partir de los 40 min después de la interrupción del GABA (Fig. 13; círculos blancos, n=23).

En esta nueva condición de excitabilidad, en la que el Fnz bloqueó la abstinencia inducida por GABA, el protocolo de estimulación por pulsos pareados reveló la persistencia de la actividad del sistema GABAérgico, es decir, se mantiene una inhibición recurrente significativa a intervalos de estimulación cortos (30 ms) semejante a las condiciones control (Fig. 14B, n=8; $P < 0.5$).

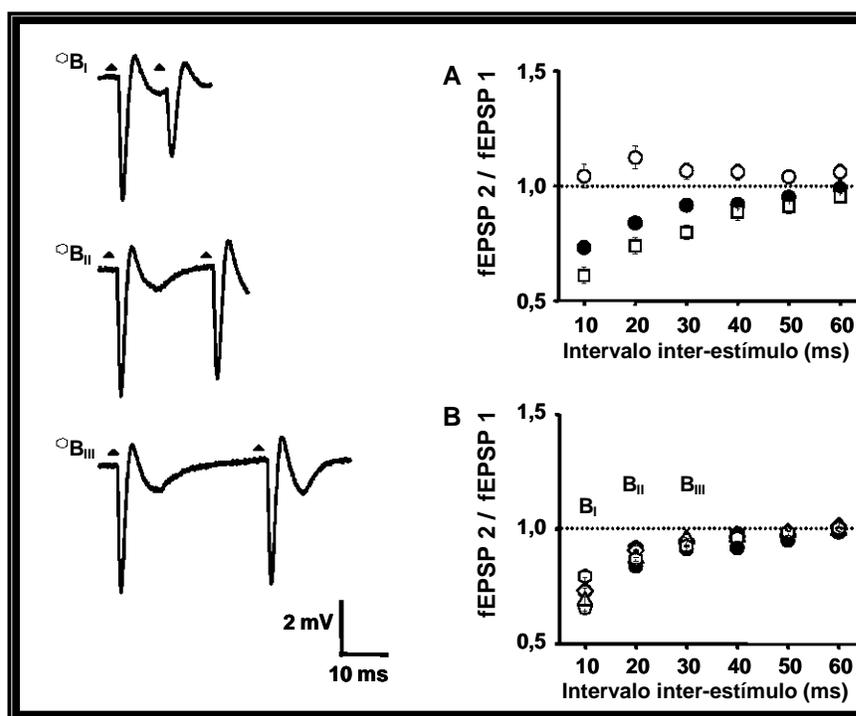


Figura 14. La pre-exposición de Fnz bloquea la facilitación por pulsos pareados característica de la abstinencia a GABA. (A) Es el resumen de los resultados por pulsos pareados en las 3 condiciones básicas de la primer parte de esta tesis: círculos negros: control. En cuadrados, el efecto de la exposición de GABA 5 mM. En círculos blancos, la pérdida de la inhibición recurrente en condiciones de hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA. (B) En condiciones de un tratamiento previo con Fnz (60 μ M/60 min) el cual, bloquea la hiperexcitabilidad de la abstinencia a GABA, la inhibición recurrente se mantiene durante la perfusión con Fnz (pentágonos), 0 min (rombos); 60 min (triángulos) y 120 min (hexágonos) de la interrupción de la superfusión de GABA. En el panel de la izquierda, se muestran los registros de 3 fEPSPs a 120 min, posterior a la exposición de GABA previamente tratados con Fnz, B_I refiere un intervalo de 10 ms, B_{II} a 20 ms y B_{III} a 30 ms; nótese la persistencia de la inhibición recurrente en estas 3 condiciones, contrastando con la Fig.9a-c.

El pre-tratamiento de Fnz además de bloquear la hiperexcitabilidad inducida por GABA, también inhibe la aparición de la facilitación por pulsos pareados.

En síntesis, los resultados muestran que un periodo corto de exposición de Fnz no induce abstinencia, sin embargo, si reduce la hiperexcitabilidad de la abstinencia a GABA del área CA1 del hipocampo. Para aceptar la contundencia de estos últimos datos, es necesario resolver un par de cuestionamientos: A) ¿existe la posibilidad de que, el bloqueo de la hiperexcitabilidad por interrupción de exposición a GABA, debido a la administración previa de Fnz, sea un efecto tóxico sobre la rebanada de hipocampo? y B) ¿es posible que el periodo prolongado de exposición a dos agonistas del receptor GABA_A (3h) induzca modificaciones sobre el receptor, desensibilizándolo y entonces esto genere un nuevo estado farmacológico del receptor? Ambas preguntas dirigieron la última secuencia de experimentos de la presente tesis.

Para descartar un posible efecto tóxico inducido por la administración prolongada de agonistas del receptor GABA_A y verificar la sensibilidad GABAérgica del tejido, se realizaron experimentos en los cuales, se verificó inicialmente el bloqueo de la hiperexcitabilidad que induce la abstinencia a GABA por la pre-exposición de Fnz (n=11) y posteriormente, se realizaron dos pruebas: una farmacológica y otra de cambio de excitabilidad.

La prueba farmacológica, se llevo a cabo de la siguiente manera: después de 30 min de constatar el bloqueo de la hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA debido a la administración previa de Fnz, un grupo de estas rebanadas fue expuesto a un antagonista del receptor GABA_A, la Bic (20 μ M; n=5); el bloqueo del receptor por el antagonista indujo un incremento inmediato en la amplitud de los fEPSPs (Fig. 15; 174 ± 35 %; barra Fnz→GABA+Bic; n=6), efecto semejante al cuantificado en el grupo de rebanadas control 179 ± 8 % (n=5). El efecto de este antagonista también fue cuantificado en condiciones de hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA, en estas rebanadas, la Bic provocó un incremento discreto en la amplitud (previamente ya aumentada) de los fEPSPs, 113 ± 8 % (Fig. 15; barras Hiperexcitabilidad+Bic; n=5; 2.5 hrs después de la interrupción de la superfusión de GABA). Defiendo por analogía con los valores reportados por Casasola (2001), que durante la abstinencia a GABA *in vitro*, el número de receptores funcionales ha disminuido.

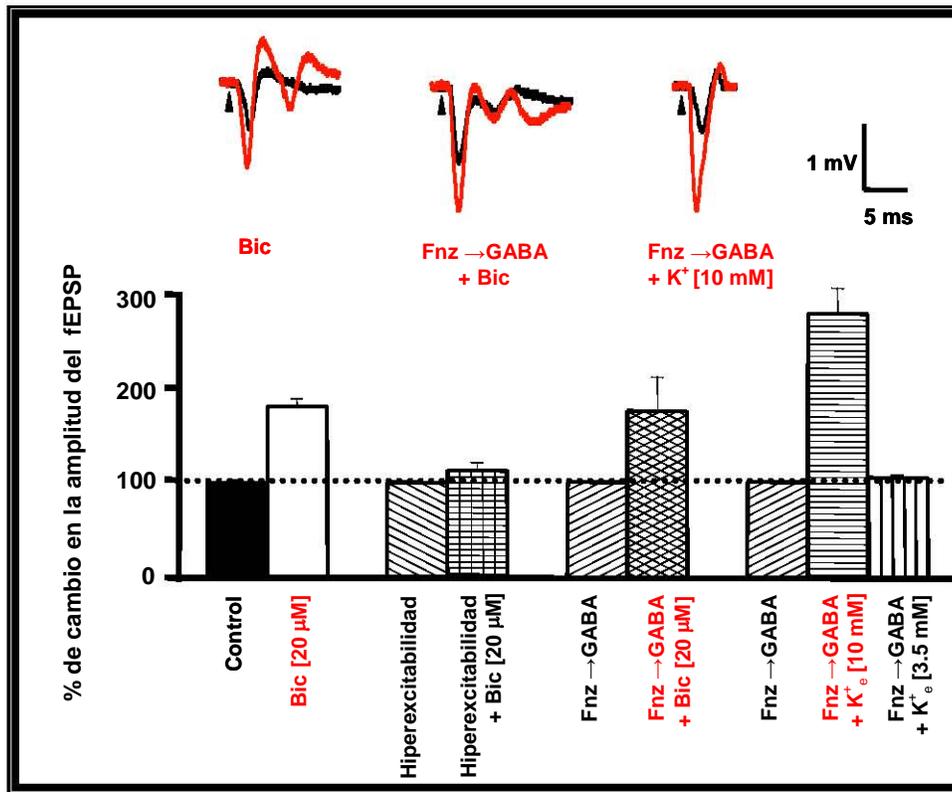


Figura 15. Las condiciones de excitabilidad de la región CA1 del hipocampo durante el bloqueo por Fnz de la hiperexcitabilidad de la abstinencia a GABA, son semejantes a las condiciones control. Primer panel inferior izquierdo, muestra el efecto de Bic (20 μM), un bloqueador del receptor GABA_A en condiciones control (n=5; P< 0.001). Segundo panel de izquierda a derecha se muestra una reducción en la eficacia de la Bic en condiciones de hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA (hiperexcitabilidad + Bic; n=5). Tercer panel de izquierda a derecha, muestra el incremento significativo en la amplitud del fEPSP inducido por Bic en rebanadas en condiciones en la que se cuantifico el bloqueo de la abstinencia a GABA por Fnz (Fnz →GABA+Bic; n=6; P< 0.001). Panel derecho, es el grafico de la modificación de las concentraciones de K⁺ extracelular en rebanadas en las que se bloqueo la abstinencia a GABA por Fnz, el incremento de la amplitud de los fEPSPs fue inducido al aumentar el K⁺ extracelular a 10 mM (Fnz →GABA+ K⁺ 10 mM; n=6; P< 0.001), la exposición de 3.5 mM de K⁺ permite recuperar los valores iniciales de la amplitud de los fEPSPs (Fnz →GABA+ K⁺ 3mM; n=6).

En otro grupo de rebanadas, después de cuantificar el bloqueo de la abstinencia a GABA, se realizó el experimento de cambiar la excitabilidad del tejido de la siguiente manera, 30 min después de que la amplitud de los fEPSPs retornaron a valores de la línea base, se incrementó la concentración de K⁺ extracelular (de 3.5 a 10 mM en la solución de registro), esta variación induce el aumento de la amplitud de los fEPSPs alcanzando hasta un 276±26 % (valorado a los 5 min de haber sido expuesto alto K⁺ extracelular; Fig. 15 barra Fnz→GABA+ K⁺ 10 mM; n=6 ; P<0.001), esta despolarización es reversible, ya que al restituir la concentración extracelular normal de este catión, 3.5 mM, la amplitud de los

fEPSPs adquirió el valor de la línea base con la que se iniciaron estos experimentos: (Fig. 15; 105 ± 3 %; barra Fnz \rightarrow GABA+ K^+_e 3 mM; n=6).

La respuesta inducida por Bic, o por el incremento de K^+_e en los tejidos en los que la abstinencia a GABA fue bloqueada por la administración previa de Fnz, indica que el tejido estaba en condiciones de incrementar su excitabilidad, descartando con esto un efecto de toxicidad y muerte neuronal por un tiempo prolongado de estimulación.

La sensibilidad del tejido a Bic en condiciones de bloqueo de la abstinencia, fue semejante a las que muestra un tejido en condiciones control, lo que sugiere que el receptor es funcional y conserva su actividad.

IX Discusión

1. Registro sináptico del área CA1 del hipocampo: dos estratos distintos, efectos semejantes.

El presente trabajo de tesis muestra que el área CA1 del hipocampo es susceptible de desarrollar hiperexcitabilidad *in vitro* por el efecto de una infusión y retiro abrupto de GABA, trabajos previos muestran este hallazgo (García-Ugalde et al., 1992; Casasola et al., 2001, 2004); sin embargo, los experimentos realizados en esta tesis guardan una diferencia fundamental respecto al sitio de registro de los trabajos previamente publicados. En el presente trabajo los registros fueron realizados en la zona de ingreso sináptico con la mayor actividad de interneuronas GABAérgicas de esta área del hipocampo: el *estrato radiatum*, el cual representa el mayor árbol dendrítico de todos los estratos del hipocampo. De tal forma, que la morfología de la actividad sináptica es un auténtico fEPSP, y como lo constata García-Ugalde G y colaboradores (1992) y Casasola C y colaboradores (2001), los registros de ambos trabajos fueron realizados directamente del *estrato piramidale*, región en la que el 90% de los componentes son somas de las neuronas piramidales, por lo que la morfología de la actividad sináptica de ese estrato es rápida, de latencia media y de gran amplitud, lo que comúnmente se ha denominado espiga poblacional o PS por sus siglas en inglés.

La PS tiene como principal característica que es una respuesta estereotipada de esta región del hipocampo, pero con la propiedad de ser una respuesta que fácilmente se contamina desde la perspectiva electrofisiológica, ya que el registro de la PS comúnmente establece un flujo reverberante en paralelo entre neuronas piramidales y otro en serie a través de comunicaciones dendríticas, lo que explica en parte que la PS tenga varios componentes en su morfología. A diferencia de esto, los fEPSPs son respuestas pequeñas, de latencia rápida y de cinéticas lentas, que difícilmente generan componentes adicionales a la respuesta inicial.

El registro de los fEPSPs en el árbol dendrítico establece una mejor perspectiva de los mecanismos de ingreso de información a las poblaciones neuronales. Debido a que la mayor expresión de receptores ionotrópicos del GABA se localiza en el árbol dendrítico, la decisión de trabajar en este estrato del área CA1 hipocampal tiene impacto en los resultados

que obtuvimos en la inducción y la disminución de la excitabilidad neuronal por la abstinencia a GABA.

Semejante al incremento máximo de la amplitud de la PS por la abstinencia a GABA que cuantificó García-Ugalde y colaboradores 1992 (200 %) y Casasola y colaboradores 2001, 2004 (250 %), los resultados de la presente tesis muestran que el incremento máximo de los fEPSPs fue de 258 ± 21 % (Fig. 8), lo que muestra que el incremento en la amplitud de la PS y el fEPSP son semejantes.

La magnitud del incremento de la respuesta sináptica en función a la fuerza de la estimulación de nuestros resultados (Fig. 10) tiene analogía con la serie de experimentos previamente publicados en el 2001 (Casasola et al.) en el cual se describe que en el *estrato piramidale*, en condiciones de hiperexcitabilidad por la abstinencia a GABA, existe un desplazamiento de esta curva a la izquierda. Nosotros en el presente trabajo de tesis reportamos este mismo desplazamiento asociado a un corrimiento a la derecha de la misma curva en condiciones de una superfusión de GABA 5 mM.

En condiciones control, la estimulación por pulsos pareados muestra inequívocamente una inhibición de la segunda respuesta en periodos cortos interestímulos (<40 ms), por ejemplo, Casasola et al., mostró que a un intervalo interestímulo de 20 ms, genera una relación de pulsos pareados de 0.64; nuestros resultados en ese mismo intervalo muestran un cociente de 0.83. En contraste, durante la falla de la actividad GABAérgica que se observa en la abstinencia a GABA, en el mismo protocolo de pulsos pareados en los experimentos del presente estudio, muestran una relación de 1.12 (Fig. 9) discretamente menor a 1.4, reportada por Casasola y colaboradores (2001). Es decir, no obstante al sitio de registro de la actividad sináptica, no existen grandes diferencias de nuestros resultados con respecto a reportes previos.

2. La hiperexcitabilidad por abstinencia al GABA: sustratos moleculares.

Anterior a esta tesis, se ha demostrado que las condiciones de hiperexcitabilidad, así como la sustitución de la inhibición recurrente por la aparición de la facilitación por pulsos pareados, es la expresión de cambios en el componente post-sináptico, específicamente, a nivel del receptor GABA_A, estos cambios se pueden enunciar de la siguiente forma: se induce, a) una *down regulation* del receptor GABA_A en CA1 (Casasola et al., 2001), la cual

es transitoria en corteza cerebral (Calixto et al., 2000), b) desensibilización del receptor (Barnes et al., 1996); además de una posible c) modificación en la conformación de nuevos receptores como *up/down regulation* de algunos subtipos de subunidades que conforman al receptor, por ejemplo: el intercambio de la subunidad $\alpha 4$ por $\alpha 1$ (Smith et al., 2001, Smith y Gong, 2005), lo cual modifica sustancialmente la actividad farmacológica de esta neurotransmisión inhibitoria.

A las modificaciones post-sinápticas se une el hallazgo reciente de que en condiciones semejantes, *in vitro*, el componente pre-sináptico tiene un papel fundamental en el desarrollo de los mecanismos de inicio de la abstinencia a GABA, particularmente que la liberación de GABA disminuye significativamente (Calixto et al., 2000). Esto es el resultado de los siguientes eventos: durante un fenómeno de incremento sostenido de la concentración de GABA en el hipocampo, las neuronas piramidales del área CA1 inician un proceso de síntesis y liberación de endocannabinoides, los cuales tienen receptores en los botones terminales de las interneuronas GABAérgicas de tipo CB1, los endocannabinoides, actúan de esta manera como neurotransmisores retrógrados. La activación de los receptores CB1 generan una disminución del ingreso de Ca^{2+} pre-sináptico, lo que disminuye la liberación del GABA, esto favorece la instalación de un proceso conocido como: despolarización inducida por supresión de la inhibición (DSI, por sus siglas en inglés; Pitler y Alger, 1994; Wilson y Nicoll, 2001; Moler, 2006). Es decir, la abstinencia de GABA, *in vitro*, genera una disminución en el número de receptores $GABA_A$, la aparición de nuevos receptores $GABA_A$ con una sensibilidad farmacológica distinta, asociada a una disminución progresiva de la liberación del neurotransmisor en el espacio sináptico. Todo lo anterior conlleva a una reducción de la neurotransmisión GABAérgica asociada a un incremento en la expresión de los mecanismos de neurotransmisión excitatorios en el tejido cerebral.

Este fenómeno de hiperexcitabilidad que induce el GABA no es específico para el neurotransmisor, ya que algunas Bzs (como el caso del Dz y el Fnz), los neuroesteroides (aloP), el alcohol y algunos barbitúricos, inducen modificaciones semejantes sobre el receptor $GABA_A$, lo cual puede ser el sustrato común de estos fenómenos farmacológicos (Calixto et al., 2000; Smith y Gong, 2005; Krystal et al., 2006).

Las abstinencias inducidas por sustancias y agonistas del receptor GABA_A no tienen la misma expresión clínica, duración y sustrato molecular. El contexto clínico, epidemiológico y experimental muestra que la abstinencia más común es la que desarrolla el alcohol (Follesa et al., 2006; Krystal et al., 2006); aunque la de más difícil manejo hospitalario es la que generan las Bzs (Vicens et al., 2006; Gold et al., 2007). Sin embargo, la abstinencia con la mayor frecuencia natural a la que se enfrentan los mamíferos es la inducida por los neuroesteroides (Mejewska 1992; Ford et al., 2005).

No obstante la diferencia de las manifestaciones clínicas en los diferentes tipos de abstinencias o la hiperexcitabilidad neuronal del modelo animal-experimental inducido por la interrupción de la administración de estas drogas y sustancias, el consenso experimental en relación al origen en común de las abstinencias es la modificación de la expresión de las subunidades del receptor GABA_A que lo hacen menos sensible al agonista(s), es decir, la inducción de un nuevo estado farmacológico del receptor es el mecanismo clave que desencadena toda la secuencia de eventos que conducen a la reducción gradual en el sistema de inhibición del cerebro (Mohler, 2006; Hadley y Amin, 2007).

Hacemos énfasis que trabajos recientes clínicos y de biología molecular asociados a electrofisiología apoyan la idea de que: 1) la manifestación clínica de una abstinencia (Kan et al., 2006; Martín-García et al., 2007), 2) los cambios en la desensibilización del receptor (Finn et al., 2006), 3) las modificaciones en la cinética de apertura del canal y los cambios de las corrientes macroscópicas y microscópicas del receptor GABA_A, pueden revertirse por exposiciones previas, secuenciadas o coadyuvadas con agonistas y entre agonistas del mismo receptor GABA_A(Ford et al., 2005; Lagrange et al., 2007).

El mecanismo de inicio de las abstinencias a neuroesteroides, Bzs y alcohol, es posible que se deba a una sustitución de la subunidad $\alpha 1$ por $\alpha 4$ del receptor GABA_A, por lo tanto, parar, revertir o evitar este punto es lo que evita la generación de los cambios sinápticos que inician y mantienen a los síndromes de abstinencia (Follesa et al., 2003; Smith y Gong, 2005; Sigel et al., 2006; Biggio et al., 2007; Lagrange et al., 2007).

3. El Fnz no induce abstinencia pero si reduce la abstinencia a GABA *in vitro*.

En el contexto de que conocemos mejor a nivel molecular lo que sucede con las abstinencias originadas por el alcohol, las Bzs y los neuroesteroides y en menor proporción

con lo que sucede con la abstinencia que genera el GABA, es importante mencionar que en condiciones semejantes *in vitro*, en rebanadas de corteza cerebral, el Fnz genera hiperexcitabilidad neuronal semejante a la que induce el GABA (Calixto et al., 2000). Es posible sugerir la analogía de lo que sucede entre los procesos que induce la Bz (Fnz) con lo que hace el neurotransmisor (GABA). Esta fue la razón de elegir la concentración y los tiempos de exposición utilizados presentados en los experimentos de las figuras 11-15.

El Fnz a diferencia del GABA, no reduce la amplitud del fEPSP del área CA1 del hipocampo durante la superfusión (Fig.11). Asimismo, no cambia la inhibición recurrente cuantificada por el protocolo de pulsos pareados durante la exposición con la Bz y hasta 3h después interrumpir la exposición (Fig. 12). Este efecto se debe a que el sitio de reconocimiento del receptor por la Bz es distinto al sitio de pegado del GABA (McDonald y Olsen, 1994; Hevers y Luddens, 1998) además de que el Fnz es un modulador alostérico positivo y necesita de la presencia de GABA para ejercer sus efectos sobre la neurotransmisión (Knapp et al., 1990). No obstante, existe la posibilidad de que el Fnz puede generar efectos GABA-agonistas sólo si sus concentraciones alcanzan rangos mM o su exposición es a largo plazo (Mattila y Larni, 1980).

El Fnz reduce la manifestación de la hiperexcitabilidad inducida por la abstinencia a GABA, aspecto farmacológico semejante en la reducción de la abstinencia de alcohol que hace esta misma Bz al evitar la expresión de la subunidad $\alpha 4$ en neuronas del cerebelo (Follesa et al., 2003) con potencia farmacológica semejante a la cuantificada por el GHB. Asimismo, el Dz, otra Bz, reduce la abstinencia al alcohol evitando el cambio de subunidades del receptor GABA_A, evento que no puede evitarlo el baclofén (Sanna et al., 2003).

Aspectos de bloqueo semejante pero con otros agonistas del receptor GABA_A son los que indican que la exposición conjunta de GHB y alcohol reducen la abstinencia a alcohol (Follesa et al., 2004); o que la misma abstinencia a alcohol puede bloquearse por la administración de un neuroesteroide, la aloP, además de que el sustrato de este evento es el de evitar la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A (Smith y Gong, 2005).

Además del bloqueo de la hiperexcitabilidad que caracteriza a la abstinencia a GABA *in vitro*, los datos indican que la pre-exposición de Fnz induce un estado de excitabilidad en el que persiste la inhibición por pulsos pareados (Fig. 14). Esto indica que la neurotransmisión

GABAérgica es funcional y estable en la región CA1 del hipocampo. La sensibilidad farmacológica a la Bic por parte de estos receptores muestra un estado de actividad semejante a las condiciones control (Fig.15) lo cual indica que este receptor no fue modificado al menos en su capacidad de reconocimiento del antagonista y/o en su número. Es decir, el tratamiento previo de Fnz que bloquea el incremento de la excitabilidad de la abstinencia a GABA, además permite un estado del receptor GABA_A, cuyas condiciones electrofisiológicas y farmacológicas están conservadas.

4. Posibles eventos moleculares que explican el efecto del Fnz sobre la abstinencia a GABA *in vitro*.

El alcance científico de esta parte de la discusión se limita a las analogías que pueden hacerse de trabajos previos con respecto a los resultados de la presente tesis. Sin embargo, existen posibilidades interesantes de mencionar en función de la planeación de futuros experimentos en ésta línea de investigación.

1) Es posible que en condiciones de abstinencia a GABA, la *down regulation* del receptor, asociada a la disminución de la liberación del neurotransmisor, pueda ser precedida y asociada a modificaciones estructurales en el receptor GABA_A, las cuales consisten en la disminución en la expresión de subunidades $\alpha 1$ y su sustitución por $\alpha 4$, de tal forma que estos cambios moleculares impactan en la instalación de cambios sinápticos de largo plazo (Lagrange et al., 2007). El tiempo necesario para la inducción de la abstinencia (2 h) es suficiente para que los eventos de expresión de RNAm y la síntesis de proteínas, se efectuen en el árbol dendrítico (Aakalu et al., 2001; Job y Eberwine, 2001; Smith et al., 2001; Steward y Worley, 2001; 2002; Calixto et al., 2003).

2) El efecto del Fnz en una exposición previa y corta, es susceptible de modificar este cambio de subunidades (inhibir la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A que lo hace farmacológicamente menos sensible), y con ello, inhibir el proceso de génesis de la hiperexcitabilidad inducida por GABA (Follesa et al., 2003).

3) Otra posibilidad, es que el receptor GABA_A se desensibilice por la actividad de Fnz y genere un estado distinto de activación por fosforilación. El receptor-fosforilado disminuye su actividad, generando con ello un estado refractario ante la exposición de GABA, y no desencadena los efectos electrofisiológicos de la abstinencia. Debido a que la fosforilación

del receptor cambia los estados de apertura y cierre del canal, la duración de apertura, la cinética de activación y la afinidad del pegado del ligando, es posible que la pre-exposición de Fnz puede modificar las condiciones de fosforilación de la proteína (Laidenheimer y Chapell, 1997).

4) Efecto sobre otros sistemas de neurotransmisión. Los antecedentes muestran que la hiperexcitabilidad por la abstinencia a GABA es dependiente en su inicio del receptor GABA_A y que los mecanismos subsecuentes o de mantenimiento pueden estar involucradas otras neurotransmisiones como la glutamatérgica y/o la colinérgica. Aunque la actividad del Fnz es fundamentalmente sobre la neurotransmisión GABAérgica, no podemos descartar que su exposición previa a GABA genere cambios en otros sistemas de neurotransmisión y que éstos modifiquen algunos procesos de activación.

Futuros experimentos deben demostrar la presencia de las subunidades del receptor GABA_A durante la evolución temporal de la abstinencia a GABA, valorar las posibles modificaciones en la expresión de las subunidades del receptor y compararlas con las abstinencias que inducen otros agonistas del receptor, pero en el mismo sistema de rebanadas de hipocampo, para conocer primero si en realidad el sustrato molecular de todas las abstinencias es el mismo y segundo, para cuantificar los niveles de cambios de expresión inducidos por las exposiciones previas de Fnz o algún otro agonista.

Los próximos estudios electrofisiológicos deben estar orientados a identificar el papel de dos componentes en la génesis de la hiperexcitabilidad por abstinencia a GABA: el papel de la neurona piramidal y el de la interneurona, por separado, pero estudios complementarios, para ayudar a explorar el mecanismo de la despolarización inducida por supresión de la inhibición que involucra a los endocannabinoides, especificando el papel de cada uno de éstos actores y definir el componente celular de la abstinencia a GABA. Conociendo este aspecto, será de gran utilidad saber que y a que nivel las abstinencias a otras drogas se asemejan y si es posible evitarlas utilizando la estrategia farmacológica utilizada en esta tesis.

Finalmente, la presente tesis apoya el contexto, de que la severidad de las abstinencias de drogas GABAérgicas puede ser inhibida o reducidas por estrategias farmacológicas de exposición de los agonistas del receptor. Es necesario explorar la actividad de otras sustancias o fármacos. Validando siempre, que el impacto de estos datos en el campo

clínico puede ser de ayuda al médico clínico y a nivel de la investigación básica para resolver preguntas sobre los mecanismos básicos de las abstinencias.

X Conclusiones

1. La hiperexcitabilidad neuronal en el *estrato radiatum* del área CA1 del hipocampo de la rata es debida al retiro abrupto de la exposición de GABA. Esta semejante a la cuantificada en el *estrato piramidale* (somatos de neuronas piramidales).
2. La característica electrofisiológica de esta hiperexcitabilidad es el incremento significativo de la amplitud del fEPSP asociado a la pérdida de la inhibición recurrente 1 h después de la interrupción abrupta de la infusión del aminoácido.
3. La exposición de Fnz (60 μ M) a un periodo corto (60 min) no induce hiperexcitabilidad neuronal.
4. La exposición de Fnz (60 μ M) de forma previa a la de GABA, es capaz de inhibir la abstinencia a inducida por este neurotransmisor. La amplitud del fEPSP es igual a las condiciones control (4 h después de interrumpir la exposición de GABA) y reaparece la inhibición recurrente.
5. En condiciones del bloqueo de la hiperexcitabilidad de la abstinencia a GABA por Fnz, el receptor GABA_A conserva sus propiedades farmacológicas.

XI Referencias

1. Aakalu G, Smith WB, Nguyen N, Jiang C, Schuman EM (2001) Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30: 489-502.
2. Araki T, Kiyama H, Tohyama M (1992a) The GABA_A receptor γ 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Mol Brain Res* 15: 121-132.
3. Araki T, Kiyama H, Tohyama M (1992b) Region specific expression of GABA_A receptor α 3 and α 4 subunits mRNAs in the rat brain. *Mol Brain Res* 12: 293-314.
4. Avoli M, Hwa G, Louvel I, Kurcewicz R, Pumain R, Lacaille JC (1997) Functional and pharmacological properties of GABA mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 526-534.
5. Barnes EM Jr (1996) Use-dependent regulation of GABA_A receptors. *Int Rev Neurobiol* 39: 53-76.
6. Bazemore A, Elliott K, Florey E (1956) Factor I and gamma-aminobutyric acid. *Nature*. 178:1052-1053.
7. Biggio F, Gorini G, Caria S, Murru L, Sanna E, Follesa P (2007) Flumazenil selectively prevents the increase in alpha(4)-subunit gene expression and an associated change in GABA(A) receptor function induced by ethanol withdrawal. *J Neurochem* 102: 657-666.
8. Bond A, Seijas D, Dawling S, Lander M (1994) Systemic absorption and abuse liability of snorted flunitrazepam. *Addiction* 89: 821-830.
9. Bonnet U, Bingmann D (1995) GABA_A -responses of CA3 neurons: contribution of bicarbonate and of Cl⁽⁻⁾-extrusion mechanisms. *Neuroreport* 6: 700-704.
10. Borman J (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *TINS* 11: 112-116.
11. Bovolin P, Santi M, Memo M, Costa E, Grayson D (1992) Distinct developmental patterns of expression of rat α 1, α 5, γ 2s and γ 2l γ -aminobutyric acid-a receptor subunit mRNAs *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 59: 62-72.
12. Bowery N (1990) GABA transporter protein cloned from rat brain. *TIPS* 11: 435-437.

13. Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Naquet R (1987) Epileptogenic γ -aminobutyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci Lett* 74: 75-80.
14. Brailowsky S, Kunimoto M, Silva-Barrat C, Richie D, Naquet R (1988) The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res* 442: 175-179.
15. Brailowsky S, Silva-Barrat C, Ménini C, Richie D, Naquet R (1989) Effects of localized, chronic GABA infusion into different cortical areas of photosensitive baboons, *Papio, papio*. *Electroencephalography and Clin Neurophysiol* 72: 147-156.
16. Brailowsky S, Kunimoto M, Silva-Barrat C, Menini C, Naquet R (1990) Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia* 31: 227-228.
17. Brailowsky S (1991) The GABA-withdrawal syndrome. *Proc West Pharmacol Soc* 34: 227-228.
18. Brailowsky S, Montiel T, Hernández E, Marescaux C, Vergnes M (1992) Effects of 3-hydroxy,3-ethyl,3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy. *Epilepsy Res* 11: 167-172.
19. Brailowsky S, García O (1999) Ethanol, GABA and epilepsy. *Arch Med Research* 30: 3-9.
20. Browing M, Bureau M, Dudek E, Olsen R (1990) Protein kinase C and cAMP dependent protein kinase phosphorylate the β subunit of the purified γ -aminobutyric acid A receptor. *PNAS* 87: 1315-1318.
21. Brown J, Wood M, Coldwell M, Briston D (1998) γ -aminobutyric acid A receptor function is desensitized in rat cultured cerebellar granule cells following chronic flunitrazepam treatment. *J Neurochem* 71: 1232-1240.
22. Buck K, Hahner L, Sikela J, Harris A (1991) Chronic ethanol treatment alters brain levels of γ -aminobutyric acid A receptor subunit mRNAs: relationship to genetic differences in ethanol withdrawal seizures severity. *J Neurochem* 57: 1452-1455.
23. Bureau M, Olsen R (1990) Multiple distinct subunits of the γ -aminobutyric acid-A receptor protein show different ligand-binding affinities. *Mol Pharm* 37: 497-502.
24. Bureau M, Laschet J (1995) Endogenous phosphorylation of distinct gamma-aminobutyric acid type A receptor polypeptides by Ser/Thr and Tyr

kinase activities associated with the purified receptor. *J Biol Chem* 270: 26482-26487.

25. Calixto E, Lemini C, Montiel T, Brailowsky S (1995) Allopregnanolone potentiated GABA Withdrawal Syndrome. *Neuroscience Letters*. 195: 71-73.

26. Calixto E, López-Colomé AM, Casasola C, Montiel T, Bargas J (2000) Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Res* 39: 13-26.

27. Calixto E, Thiels E, Klann E, Barrionuevo G (2003) Early maintenance of MF LTP depends on protein and RNA synthesis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampus dendritic spines. *J Neurosci* 23: 4842-4849.

28. Casasola C, Bargas J, Arias-Montaña JA, Calixto E, Montiel T, Galarraga E, Brailowsky S (2001) Hippocampal hyperexcitability induced by GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA_A receptors. *Epilepsy Res* 47: 257-271.

29. Casasola C, Montiel T, Calixto E, Brailowsky S (2004) Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neurosci* 126: 163-171.

30. Cash D, Serfozo P, Allan A (1997) Desensitization of a γ -aminobutyric acid type A receptor in rat is increased by chronic treatment with chlorodiazepoxide: a molecular mechanism of dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 704-711.

31. Chebib M, Johnston G (1999) The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 937-940.

32. Churn S, DeLorenzo R (1998) Modulation of GABAergic receptor binding by activation of calcium and calmodulin-dependent kinase II membrane phosphorylation. *Brain Res* 809: 68-76.

33. Clark M, Massenburg G, Weiss R (1994) Post analysis of the hippocampal GABA_A receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Mol Brain Res* 26: 309-319.

34. Clark M (1998) Sensitivity of the rat hippocampal GABA_A receptor α 4 subunit to electroshock seizures. *Neurosci Lett* 250: 17-20.

35. Costa E (1987) Polytypic signaling at GABAergic synapses. *Life sciences* 42: 1407-1417.

36. Covarrubias M, Tapia R (1980) Brain glutamate descarboxilase: properties of its calcium-dependent binding to liposomes and kinetics of the bound and the free enzyme. *J Neurochem* 34: 1682-1688.
37. Cox, Lebalnc, Marshan (1983) *Drugs and drugs abuse*. Addiction Research Fundation, Canada 432 pp.
38. Creager R, Dunwiddie T, Lynch G (1980) Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J Physiol* 299: 409-429.
39. DeLorcy T, Olsen R (1994) GABA and glycine. In: *Basic neurochemistry* (Siegel G, Agranoff B, Molinoff B, eds), New York, USA: Raven press.
40. Depoortere H, Decober M, Honoré L (1983) Drug effects on the varios species of laboratory animals. *Neuropsychobiol* 9: 244-249.
41. Deutch A, Roth R (1999) Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond M, Bloom F, Landis S, Roberts J, Squire L, eds), California USA.
42. Doble A, Martin I (1996) The GABA_A/benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. In: *Neuroscience Inteligent Unit*. (Champan, Hill., eds). USA.
43. Essrich C, Lorez M, Benson J, Fritschy J, Luscher N (1998) Postsynaptic clustering of major GABA(A) receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nature-Neurosci* 1: 563-571.
44. Feldman A, Meyer C, Quesner C (1996) *Principles of Neuropsychopharmacology*. Academic Press.
45. Finn DA, Douglass AD, Beadles-Bohling AS, Tanchuck MA, Long SL, Crabbe JC (2006) Selected line difference in sensitivity to a GABAergic neurosteroid during ethanol withdrawal. *Genes Brain Behav* 5: 53-63.
46. Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Mostallino MC, Manca A, Mascia MP, Busonero F, Talani G, Sanna E, Biggio G (2003) Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Molecular Pharmacology* 63: 896-907.
47. Follesa P, Biggio F, Mancuso L, Cabras S, Caria S, Gorini G, Manca A, Orru A, Biggio G (2004) Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the alpha2 subunit of the GABA_A receptor and its prevention by diazepam or gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 130-137.

48. Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G (2006) Neurosteroids, GABA_A receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacol* 186: 276-280.
49. Ford MM, Nickel JD, Finn DA (2005) Treatment with and withdrawal from finasteride alter ethanol intake patterns in male C57BL/6J mice: potential role of endogenous neurosteroids? *Alcohol* 37: 23-33.
50. Foster AC, Kemp JA (2006) Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 6: 7-17.
51. Fritschy J, Benke D, Mertens S, Oertel H, Bachi T, Mohler H (1992) Five subtypes of type A α -aminobutyric acid receptor identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *PNAS* 89: 6726-6730.
52. Frosch M, Lipton S, Dichter M (1992) Desensitization of GABA-activated current and channels in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 12: 3042-3053.
53. Fukuda H, Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Riche D, Naquet R (1987) Anticonvulsant effect of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats: focal seizures upon withdrawal. *Exp Neurol* 98: 120-129.
54. García-Ugalde G, Galarraga E, Bargas J, Brailowsky S (1992) Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci Lett* 147: 229-232.
55. García-Ugalde G, Brailowsky S (1993) Los receptores del GABA: de la electrofisiología a la biología molecular. *Ciencia* 44: 279-289.
56. Gold JA, Rimal B, Notan A, Nelson LS (2007) A strategy of escalating doses of benzodiazepines and phentobarbital administration reduces the need for mechanical ventilation in delirium tremens. *Crit Care Med* 35: 724-730.
57. Grover L, Lambert N, Schwartzkroin P, Teyler T (1993) Role of HCO₃⁻ ions in depolarizing GABA_A receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *Neurophysiol* 69: 1541-1555.
58. Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czysyk L, Keynan S, Miedel M, Davidson N, Lester H, Kanner B (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303-1306.
59. Hadingham K, Harkness P, McKernan R, Quirk K, Bourdelles B, Horne A, Kemp J, Barnard A, Ragan I, Whiting P (1992) Stable expression of mammalian type A γ -aminobutyric acid receptors in mouse cells:

demonstration of functional assembly of benzodiazepine-responsive sites. PNAS 89: 6378-6392.

60. Hadley SH, Amin J (2007) Rat $\alpha 6$, $\beta 2$, δ GABA_A receptors exhibit two distinct and separable agonist affinities. J Physiol 581: 1001-1018.

61. Hevers W, Luddens H (1998) The diversity of GABA_A receptors. Mol Neurobiol 18: 35-86.

62. Hirouchi M, Ohkuma S, Kuriyama K (1992) Muscimol-induced reduction of GABA_A receptor alpha 1-subunit mRNA in primary cultured cerebral cortical neurons. Brain Res Mol Brain Res 15: 327-331.

63. Houser C, Vaughn J, Hendry S, Jones E, Peters A (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. Functional properties of cortical cells 2.

64. Impagnatiello F, Pesold C, Longone P, Caruncho H, Fritschy J, Costa E, Guidotti A (1996) Modifications of γ -aminobutyric acid A receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to diazepam. Mol Pharmacol 49: 822-831.

65. Job C, Eberwine J (2001) Localization and translation of mRNA in dendrites and axons. Nat Rev 2: 889-898.

66. Kan CC, Mickers FC, Barnhoorn D (2006) Short-and long-term results of a systematic benzodiazepine discontinuation programme for psychiatric patients. Tijdschr Psychiatr 48: 683-693.

67. Kardos J (1999) Recent advances in GABA research. Neurochem Int 34: 353-358.

68. Karlsson G, Pozza M, Olpe H (1988) Phaclofen: a GABA_B blocker reduces long duration inhibition in the neocortex. Eur J Pharmacol 148: 485-486.

69. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor J, Bishof S, Mickel S, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froesti W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. Nature 386: 239-246.

70. Kerr D, Ong J, Prager R, Gynther B, Curtis D (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. Brain Res 405: 150-154.

71. Knapp R, Malatynska E, Yamamura H (1990) From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. Neurochem Res 15: 103-112.

72. Krishek B, Xie X, Blackstone C, Huganir R, Moss S, Smart G (1994) Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12: 1081-1095.
73. Krnjević K (1984) Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account. In: *Functional properties of cortical cells*. New York USA. Plenum press.
74. Krnjević K (1991) Significance of GABA in brain function. In: *GABA mechanism in epilepsy* wiley-Liss, Inc. USA.
75. Krnjević K (1997) Role of GABA in cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 439-451.
76. Krystal JH, Staley J, Mason G, Petrakis IL, Kaufman J, Harris RA, Gelernter J, Lappalainen J (2006) Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 63: 957-968.
77. Kuffler S, Nichols J, Martin A (1984) *From neuron of the brain*. Massachusetts.
78. Kuriyama K, Hirouchi M, Nakayasu H (1993) Structure and function of cerebral GABA_A and GABA_B receptors. *Neurosci Res* 17: 91-99.
79. Lader M, File S (1987) The biological basis of benzodiazepine dependence. *Psychol Med* 17: 537-547.
80. Lagrange AH, Botzolakis EJ, Macdonald RL (2007) Enhanced macroscopic desensitization shapes the response of alpha4 subtype-containing GABA_A receptors to synaptic and extrasynaptic GABA. *J Physiol* 578: 655-676.
81. Lambert N, Harrison N (1990) Analogs of cyclic AMP decrease γ -aminobutyric acidA receptor mediated chloride current in cultured rat hippocampal neurons via an extracellular site. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 90-94.
82. Lander M (1994) Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur Neuropsychopharmacol* 4: 81-95.
83. LeGal La Salle G, Brailowsky S, Menini C, Naquet R (1988) Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp Neurol* 101: 411-417.
84. Leidenheimer N, McQuilkin S, Hahner L, Whiting P, Harris A (1992) Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ -aminobutyric acidA receptor: role of desensitization. *Mol Pharmacol* 41: 1116-1123.

85. Leidenheimer N, Chapell R (1997) Effects of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Mol Brain Res* 52: 173-181.
86. Liu Q, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1992) A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *PNAS* 89: 6639-6643.
87. Luddens H, Korpi R, Seeburg H (1995) GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiological implications. *Neuropharmacol* 34: 245-254.
88. Macdonald R, Olsen R (1994) GABA_A receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 17: 569-602.
89. Majewska MD (1992) Neurosteroids-endogenous bimodal modulation of the GABA_A receptor- mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol* 38: 379-395.
90. Mark L, Waltzman MD (1999) Flunitrazepam: A review of "roofies". *Ped Emer Care* 5: 59-60.
91. Martin-García E, Darbra S, Pallares M (2007) Intrahippocampal allopregnanolone decreases voluntary chronic alcohol consumption in non-selected rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 826-831.
92. Martin IL (1987) The benzodiazepines and their receptors: 25 years of progress. *Neuropharmacol* 26: 957-970.
93. Mattila MAK, Larni HM (1980) Flunitrazepam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 20: 353-375.
94. McKay AC, Dundee JW (1980) Effect of oral benzodiazepines on memory. *Br Journal Anaesth* 52: 1247-1257.
95. McKernan R, Whiting P (1996) Which GABA_A receptors subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143.
96. McLellan A, O'Brien C, Metzger D, Alterman A, Cornish J, Urshel H (1992) How effective is substance abuse treatment –compared to what? *Addictive states*. pp 231-252. New York: Raven press.
97. Mehta A, Ticku M (1999) An update on GABA_A receptors. *Brain Res Rev* 29: 196-217.
98. Mhatre M, Ticku M (1992) Chronic ethanol administration alters gammabutyric acid a receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 42: 415-422.
99. Midel G (1981) *Pharmacology. USA: Englewood Cliffs.*

100. Mohler H (2006) GABA_A receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 731-740.
101. Morrow AL, VanDoren MJ, Penland SN, Matthews DB (2001) The role of GABAergic neuroactive steroids in ethanol action, tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev* 37: 98-109.
102. Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS* 269: 181-184.
103. Nurse S, Lacaille J (1997) Do GABA_A and GABA_B inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can J Physiol Pharmacol* 75: 520-525.
104. O'Brien C (1996) Addiction and abuse of substance. In: *The Pharmacological basis of therapeutics*. (Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman A, eds), pp 595-617.
105. Ohmori Y, Kuriyama K (1991) Pharmacological and biochemical characteristics of partially purified GABA_B receptor. *Neurochem Res* 16: 357-362.
106. Olsen R, Tobin A (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J* 4: 1469-1480.
107. Paul S (1995) GABA and glycine. In: *Neuropharmacology: the fourth generation of progress* (Bloom F, Kupfer J, eds), New York, USA: Raven.
108. Perkins K, Wong R (1997) The depolarizing GABA response. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 516-519.
109. Pesold C, Caruncho J, Impagnatiello F, Berg M, Fritschy J, Guidotti A, Costa E (1997) Tolerance to diazepam and changes in GABA receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neurosci* 79: 477-487.
110. Petursson H, Lander M (1984) Dependence on tranquillisers. *Maudsley Monograph*. Oxford University Press, Oxford 28.
111. Pitler TA, Alger BE (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* 13: 1447-1455.
112. Puia G, Ducic I, Vicin S, Costa E (1993) Does neurosteroid modulatory efficacy depend on GABA_A receptors subunit composition? *Receptors and Channels* 1: 135-142.

113. Reddy DS, Kulkarni SK (1997) Neurosteroid coadministration prevents development of tolerance and augments recovery from benzodiazepine withdrawal anxiety and hyperactivity in mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19: 395-405.
114. Robinson G, Setters E, Janecek E (1981) Barbiturate and hypnosedative withdrawal by a multiple oral phenobarbital loading dose technique. *Clin Pharmacol Ther* 30: 71-76.
115. Ruano D, Cano J, Machado A, Vitorica V (1991) Pharmacologic characterization of GABA_A/benzodiazepine receptor in rat hippocampus during aging. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 902-908.
116. Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R (1994) Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of γ -aminobutyric acid. *Neurochem Int* 24: 363-368.
117. Sanna E, Mostallino MC, Busonero F, Talani G, Tranquilli S, Mameli M, Spiga S, Follesa P, Biggio G (2003) Changes in GABA(A) receptor gene expression associated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal. *J Neurosci* 23: 11711-11724.
118. Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoyer H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem Int* 34: 379-385.
119. Sigel E, Baur R, Boulineau N, Minier F (2006) Impact of subunit positioning on GABA_A receptor function. *Biochem Soc Trans* 34: 868-871.
120. Silva-Barrat C, Brailowsky S, Richie D, Menini C (1988) Anticonvulsant effects of localized chronic infusions of GABA in cortical and reticular structures of Baboons. *Exp Neurol* 101: 418-427.
121. Silva-Barrat C, Champagnat J, Brailowsky S, Menini C, Naquet R (1989) Relationship between tolerance to GABA_A agonist bursting properties in neocortical neurons during GABA withdrawal syndrome. *Brain Res* 498: 289-298.
122. Silva-Barrat C, Araneda S, Menini C, Champagnat J, Naquet R (1992) Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat. *J Neurophysiol* 67: 715-727.
123. Silva-Barrat C, Champagnat J, Menini C (2000) The GABA withdrawal syndrome: a model of local status epilepticus. *Neuronal plast* 7: 9-18.

124. Simmons MM, Cupp MJ (1998) Use and abuse of flunitrazepam. *Ann Pharmacother* 32: 117-199.
125. Smith SS, Gong Q, Li X, Moran M, Bitran D, Frye C, Hsu F (1998) Withdrawal from 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA_A -gated current and increases the GABA_A receptor α 4 subunit its association with increased anxiety. *J Neurosci* 18: 5275-5284.
126. Smith SS, Gong QH (2004) Ethanol administration rapidly reverses α 4 GABA_A receptor subunit upregulation following steroid exposure. *Neuropharmacol* 47: 9-16.
127. Smith SS, Gong QH (2005) Neurosteroid administration and withdrawal alter GABA_A receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *J Physiol* 564: 421-436.
128. Smith WB, Aakalu G, Schuman EM (2001) Local protein synthesis in neurons. *Curr Biol* 11: R 901-R 903.
129. Soltesz I, Haby M, Leresche N, Crunelli V (1988) The GABA_B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺ dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. *Brain Res* 448: 351-354.
130. Spies CD, Dubisz N, Neumann T, Blumm S, Muller C, Rommelespacher H, Brummer G, Specht M, Sanft C, Hannemann L, Striebel HW, Schaffartzik W (1996) Therapy of alcohol withdrawal syndrome in intensive care unit patients following trauma: Results of a prospective, randomized trial. *Crit Care Med* 24: 414-422.
131. Spies CD, Otter HE, Hüske B, Sinha P, Neumann T, Rattig J, Lenzenhuber E, Kox WJ (2003) Alcohol withdrawal severity is decreased by symptom-orientated adjusted bolus therapy in the ICU. *Intensive Care Med* 29: 2230-2238.
132. Squires RF (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacol* 22: 1443-1450.
133. Staley K, Soldo B, Proctor W (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269: 977-981.
134. Staley K, Proctor W (1999) Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. *J Physiol (Lond)* 519: 693-712.
135. Stelzer A, Kay A, Wong S (1988) GABA_A receptor functional in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 241: 339-341.

136. Steward O, Worley PF (2001) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapse requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30: 227-240.
137. Steward O, Worley PF (2002) Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem* 78: 508-527.
138. Tan X, Uchida S, Matsuura M, Nishihara K, Kojima T (2003) Long-intermediate- and short-acting benzodiazepine effects on human sep EEG spectra. *Psychiatry Clin Neurosci* 57: 97-104.
139. Tapia R, Sandoval M (1971) Study of inhibition of brain of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphatexime -O-acetic acid. *J Neurochem* 18: 2051-2059.
140. Tapia R, Sandoval M, Contreras P (1975) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J Neurochem* 12: 1283-1285.
141. Teuber L, Watjens F, Jensen L (1999) Ligands for the benzodiazepine binding site-a survey. *Curr Pharm Des* 5: 317-343.
142. Thompson C, Bodewits G, Stephenson A, Turner J (1992) Mapping of GABA_A receptor α 5 and α 6 subunit like immunoreactivity in rat brain. *Neurosci Letters* 144: 53-56.
143. Thompson S, Gahwiler B (1992) Comparison of the actions of baclofen at pre and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol* 451: 329-345.
144. Traub RD, Jefferys JG (1994) Are there unifying principles underlying the generation of epileptic afterdischarges *in vitro*? *Prog Brain Res* 102: 383-394.
145. Tzunashima K, Schwarzer C, Kichmair E, Sieghart W, Sperk G (1997) GABA_A receptor subunit in the rat hippocampus III. Altered messenger RNA expression in kainic acid -induced epilepsy. *Neurosci* 80: 1019-1032.
146. Vicens C, Fiol F, Llobera J, Campoamor F, Mateu C, Alegret S, Socias I (2006) Withdrawal from long-term benzodiazepine use: randomised trial in family practice. *Br J Gen Pract* 56: 958-963.
147. Wafford KA, Bain CJ, Quirk K, McKernan RM, Wingrove PB, Whiting PJ, Kemp JA (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABA_A receptor beta subunit. *Neuron* 12: 775-782.

148. Wang J, Kofuji P, Burt D (1992) Strain comparisons and developmental profile of the delta subunit of the murine GABA_A receptor. *Brain Res Bull* 29: 119-123.
149. Wilcox A, Warrington J, Gardiner K, Berger R, Whiting P, Altherr M, Wasmuth J, Patterson D, Sikela J (1992) Human chromosomal localization of genes encoding the γ 1 and γ 2 subunits of the γ -aminobutyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *PNAS* 89: 5857-5861.
150. Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.
151. Woods JH, Winger G (1997) Abuse of Flunitrazepam. *J of clin Psychopharmacol* 17: 1S-57S.
152. Wu J, Chang Y, Li G, Xue F, Dechon J, Elisworth K, Liu Q, Yang K, Bahadroani N, Zheng C, Zhang J, ReKate H, Rho JM, Kerrigan JF (2007) Electrophysiological properties and subunit composition of GABA_A receptors in patients with gelastic seizures and hypothalamic hamartoma. *J Neurophysiol* 98: 5-15.
153. Zhai J, Stewart R, Friedberg M, Li C (1998) Phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma 2L subunit in rat sensory neurons may not be necessary for ethanol sensitivity. *Brain Res* 805: 116-122.
154. Zhang J, Sato M, Tohyama M (1992) Co expression of the α 1 and β 2 subunit genes of the GABA_A receptor in the magnocellular preoptic nucleus. *Mol Brain Res* 15: 171-173.
155. DSM-IV-TR Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Criterios Diagnósticos. Masson. 2002. 347 pp.
156. Guía para el cuidado y uso de los animales en laboratorio. Academia Nacional de Medicina, 1999. 146 pp.