



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“EL SINDROME DE ABSTINENCIA A PROGESTERONA (SAProg):  
UN NUEVO MODELO DE INDUCCIÓN AGUDA DE  
EPILEPTOGÉNESIS FOCAL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**PABLO MEJÍA ARREOLA**

**DIRECTOR:**

**DR. EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ**

**MEXICO, D.F., marzo 2013**





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ  
Director General  
Dirección General de Administración Escolar  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**El síndrome de abstinencia a progesterona (SAProg): un nuevo modelo de inducción aguda de epileptogénesis focal**

realizado por **Mejía Arreola Pablo** con número de cuenta **3-0602944-6** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles	
Propietario	Dr. Víctor Manuel Torres Flores	
Propietario Tutor	Dr. Jaime Eduardo Calixto González	
Suplente	Dr. José Luis Arreola Ramírez	
Suplente	M. en C. Enrique Moreno Sáenz	

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "  
Ciudad Universitaria, D. F., a 30 de enero de 2013  
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm



Esta tesis fue realizada en el  
Departamento de Neurobiología de la  
División de Investigaciones en Neurociencias del  
Instituto Nacional de Psiquiatría  
“Ramón de la Fuente”

Tesis apoyada por el proyecto  
Igualdad entre Mujeres y Hombres 2013  
Dirección General de Investigaciones en Neurociencias  
INPRF



Tesis apoyada por el CONACyT  
(Proyecto: 166823)

GRACIAS

## **Agradecimientos**

Mi infinita gratitud y admiración por haberme dado el regalo más hermoso... **la vida**, por haberme apoyado de manera incondicional, por enseñarme el camino correcto, por acompañarme en los buenos y malos momentos muchas gracias:

A mis amados padres:

**Yolanda Arreola Franco**  
**y**  
**Arturo Mejía Chávez**

Por ser siempre y seguirá siendo mi ejemplo a seguir, por haberme enseñado a luchar en todo momento y con quien eh compartido toda mi vida gracias:

A mi amado hermano:

**Arturo Mejía Arreola**

A esa persona que por maravillosos asares de la vida a compartido momentos hermosos conmigo y por haberme apoyado en este proceso tan importante en mi vida:

A mí amada novia:

**Brenda Toledo Rojas**

A mi mentor y amigo de toda la vida y al que le debo este logro a mi respetado y querido tutor GRACIAS.

**Dr. Eduardo Calixto González**

A mis amigos de laboratorio Alejandra, Karen, Miguel y Kenji por haber compartido este tiempo conmigo y haber enriquecido este proceso en mi vida muchas gracias.

A mi profesor el **Dr. José Luis Arreola Ramírez** por haberme apoyado y permitir convivir muchas GRACIAS.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias muchas gracias.

## Índice

Lista de abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Introducción .....	12
<b>I. Antecedentes</b>	
1.....	
Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central.....	12
1.1.....	
Ácido $\gamma$ - aminobutírico GABA.....	12
1.2.....	
Síntesis y metabolismo del GABA .....	13
1.3.....	
Recaptura del GABA .....	15
1.4.....	
Receptores ionotrópicos: GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>C</sub> .....	15
1.5.....	
Receptor metabotrópico: GABA <sub>B</sub> .....	17
1.6.....	
Fisiología del sistema GABAérgico .....	19
1.7.....	
Sustancias que Modulan al Receptor GABA <sub>A</sub> .....	19
1.8.....	
Alteraciones del Sistema GABAérgico .....	20
1.9.....	
El síndrome de abstinencia a GABA.....	20
2 .....	
Neuroesteroides.....	25
2.1.....	
Mecanismos de los neuroesteroides.....	28

2.2.....	
.... Síndrome de abstinencia a Progesterona.....	29
2.3.....	
..... Bases moleculares de la abstinencia a Progesterona.....	29
3 .....	
Adicción, Tolerancia y Dependencia .....	30
4 .....	
Benzodiazepinas y Farmacología del Diazepam .....	33
4.1.....	
Abstinencia a Benzodiazepinas.....	33
4.2.....	
Farmacología del Diazepam.....	35
4.3.....	
Farmacodinamia y farmacocinética del Diazepam.....	36
4.4.....	
El síndrome de abstinencia a Diazepam .....	37
4.5.....	
Modificaciones EEG y moleculares en la abstinencia a Dz .....	38
5 .....	
Justificación.....	40
6 .....	
Objetivos.....	41
7 .....	
Hipótesis.....	41
8 .....	
Material y Métodos.....	42
8.1.....	
Sujetos.....	42
8.2.....	
Sustancias.....	42
8.3.....	
Cirugías Estereotáxicas.....	43
8.4.....	
Registro EEG.....	44

8.5.....	
Procedimiento Experimental.....	45
8.6.....	
Análisis Estadístico.....	49
9.....	
Resultados.....	50
9.1.....	
Modificaciones de la excitabilidad cortical inducido por la abstinencia a GABA (SAG).....	50
9.2.....	
Modificaciones de la excitabilidad cortical inducido por la abstinencia a Dz (SAD).....	56
9.3.....	
Caracterización electroencefalográfica de la abstinencia a P de exposición crónica (SAProg crónico).....	62
9.4.....	
Caracterización electroencefalográfica de la abstinencia a P intracortical (SAProg).....	69
9.5.....	
Comparaciones electrofisiológicas entre los diferentes síndromes de abstinencia.....	76
10.....	
Discusión.....	78
11.....	
Conclusiones.....	91
12.....	
Referencias.....	92



## Lista de Abreviaturas

$\alpha$ - KG	$\alpha$ - cetoglutarato
2-DG	2-desoxiglucosa
Bzs	Benzodiazepinas
$\text{Ca}^{2+}$	Ión calcio
$\text{Cl}^-$	Ión cloruro
CxS	Corteza somatomotora
Dz	Diazepam
EEG	Electroencefalograma
$\text{GABA}_A$	Receptor ionotrópico a GABA
$\text{GABA}_B$	Receptor metabotrópico GABA
GABA-T	GABA <i>transaminasa</i>
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
h	Hora
Hz	Hertzio (ciclo por segundo)
IPSP	Potencial Post-sináptico Inhibitorio
IPSP	Potenciales Post-sinápticos Inhibitorios
$\text{K}^-$	Ion potasio
$\text{Na}^+$	Ion sodio
P	Progesterona
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Fosfato de Piridoxal (vitamina B <sub>6</sub> )
Proteínas G	Proteínas de asociadas a nucleótidos de guanina
SAG	Síndrome de Abstinencia a GABA
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Semialdehído succínico
5 $\alpha$ -R	5 $\alpha$ -reductasa
3-HSOR	3-hidroxiesteroide oxidoreductasa
AloP	Alopregnanolona
OVX	Ovarectomizadas
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente
mg	Miligramos

ml	Mililitros
µg	Microgramos
i.p.	Intraperitoneal
mm	Milímetros
s.c	subcutáneo
NE	neuroesteroide
NMDA	N-metil D-aspartato

## RESUMEN

Los tratamientos prolongados con drogas que incrementan la actividad GABAérgica entre las que se encuentran las benzodiazepinas, los barbitúricos, el etanol y algunos neuroesteroides, generan estados de tolerancia y dependencia. La supresión abrupta de la administración de estos fármacos provoca la manifestación de síndromes de abstinencia.

Los diferentes modelos experimentales como el síndrome de abstinencia a GABA (SAG), el síndrome de abstinencia a Diazepam (Dz; SAD) y el síndrome de abstinencia a Progesterona (P) de administración crónica sistémica (SAProg crónico) tienen en común la hiperexcitabilidad neuronal originada por la súbita interrupción de la administración de GABA, Dz y P respectivamente, los cuales modulan positivamente al receptor GABA<sub>A</sub>.

Una importante premisa para este proyecto es que no conocemos si la administración intracortical de P, el modulador alostérico positivo más potente del receptor GABA<sub>A</sub> puede inducir un síndrome de abstinencia.

Para conseguir los objetivos planteados se utilizaron ratas macho a los cuales se les realizó una cirugía estereotáxica para colocar cánulas intracorticales y electrodos epidurales para la administración de fármacos y obtención de registro electroencefalográfico (EEG). La interrupción de la administración de P intracortical en la corteza somatomotora derecha indujo un incremento en la excitabilidad neuronal con latencia de aparición de 15 min, caracterizado por el aumento significativo en la potencia del EEG consecuencia de la actividad espiga-onda propagable al hemisferio contralateral de la instilación. Tanto el número de complejos espiga-onda, la potencia del EEG y el correlato del porcentaje de aumento de espigas con respecto al porcentaje de incremento de la potencia del SAProg intracortical fue significativamente mayor que el SAG > SAD > SAProg crónico.

Los resultados indican que el SAProg intracortical muestra mayor excitabilidad por la abstinencia a P que la inducida por otros agonistas del mismo receptor. La propuesta de la modificación sináptica que induce este neuroesteroide es a través de cambios agudos pre y post-sinápticos que disminuyen la inhibición GABAérgica cortical de inicio y eventualmente se modifican otras neurotransmisiones. Este es el primer proyecto que estudia esta variable en el cerebro de la rata macho.

## INTRODUCCIÓN

La presente tesis tiene como objeto estudiar un nuevo modelo de epileptogénesis focal desarrollada por la abstinencia aguda a P a partir de cambios en la actividad GABAérgica, estudiando las diferencias electroencefalográficas que generan los diferentes agonistas del receptor GABA<sub>A</sub> como lo son: el Dz, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la P. Por esta razón los antecedentes se encuentran desarrollados para describir al sistema GABAérgico, su fisiología, receptores y farmacología, continuando con una descripción de los neuroesteroides y los antecedentes inmediatos en el campo de las neurociencias que involucran a los neuroesteroides con capacidad para desarrollar síndromes de abstinencia. La tercera parte de esta introducción está basada en la descripción de tolerancia y dependencia, así como la exposición de los antecedentes de la abstinencia a benzodiacepinas, específicamente el Dz.

### 1. Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central

#### 1.1 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico mejor conocido como GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos, en los años 50's se descubrió que este aminoácido no sólo se encontraba en el cerebro, sino que era el órgano que más GABA contenía (Olsen, 2000; Murray *et al*, 2001; Cortés-Romero, 2011).

La primera evidencia de que el GABA actuaba como un transmisor inhibitorio fue cuando Krnjevic' and Schwartz (1984; 1991) compararon las propiedades de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP). Esto significa que su acción es hiperpolarizar a la neurona postsináptica y tiene como consecuencia disminuir la probabilidad de una neurona para generar un potencial de acción, esta inhibición se debe a que el GABA al unirse con su receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> aumenta la

corriente entrante de  $\text{Cl}^-$  y el interior de la célula se vuelve más negativo, disminuyendo así la excitabilidad (Carlson, 2006; Olsen, 2000; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988).

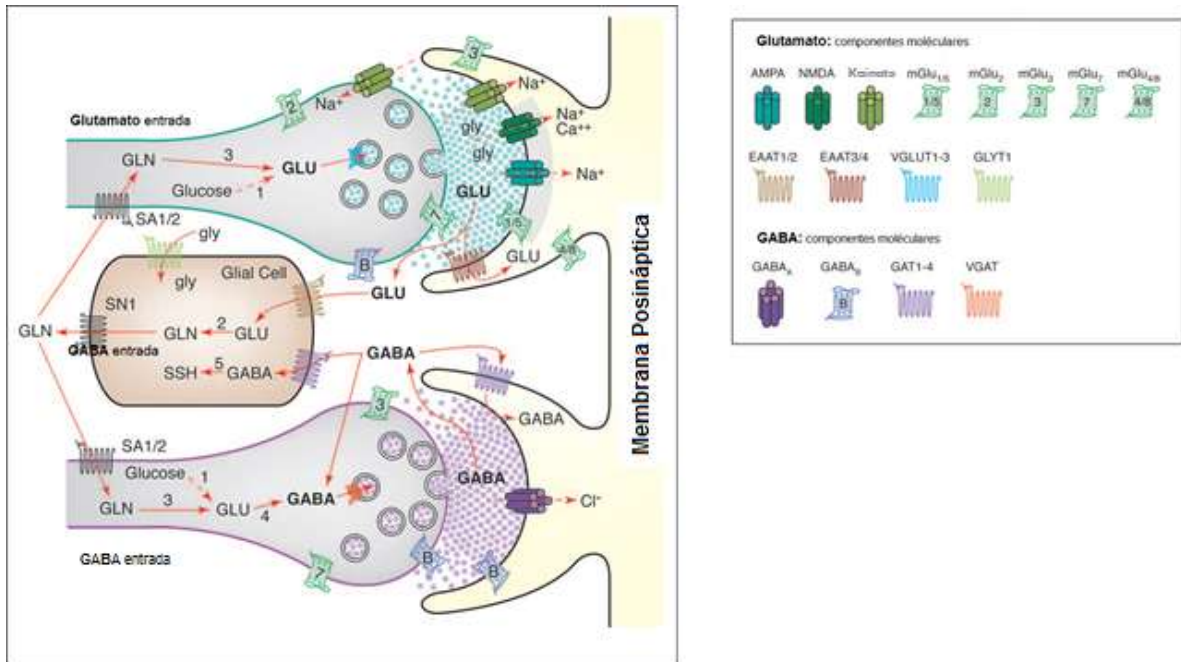
Las neuronas GABAérgicas tienen una distribución amplia y difusa en el cerebro, de esta forma se sabe que actúan como interneuronas, sin embargo, existe vías GABAérgicas como la vía estriado-nigral y la vía cerebelo-vestibular. El GABA es muy importante debido a que su papel es controlar la excitabilidad y el disparo neuronal (Bormann, 1988).

## **1.2 Síntesis y metabolismo del GABA**

El GABA es sintetizado a partir del neurotransmisor más común en el SNC cuyas propiedades son, paradójicamente excitatorias: el ácido glutámico, que es producto de la desaminación oxidativa de la glutamina o derivado directo de un metabolito intermediario de la oxidación de la glucosa, en el ciclo Krebs, el  $\alpha$ -cetoglutarato. (Figura 1; Foster y Kemp, 2006; Murray *et al*, 2001; Olsen 2000; Kandel *et al*, 2001).

Para sintetizar el GABA, el ácido glutámico es descarboxilado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), también conocida como L-glutamato-1-carboxilasa-liasa, que elimina un grupo carboxilo y necesita la presencia de vitamina B<sub>6</sub> (fosfato de piridoxal) para su óptimo funcionamiento (Herrera, 1986).

La mayoría del glutamato y del GABA que son usados como neurotransmisores son derivados de la pozas de glutamina que se encuentran en las células gliales (Olsen, 2000), utilizan al  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) para reducirlo a semialdehído succínico (SSA) y a glutamato, esta reacción es catalizada por la enzima GABA *transaminasa* (GABA-T) también dependiente de fosfato de piridoxal. Un aspecto interesante es que la enzima que produce a su sustrato (ácido glutámico) también lo degrada, es decir, que la GABA-T es la clave de la síntesis y del catabolismo del GABA (Figura 1 panel inferior; Foster *et al*, 2006; Murray *et al*, 2001; Herrera, 1986; Paul, 1995).



**Figura 1.** Diagrama de los componentes de los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y glutamatergico. Las vías metabólicas o enzimas están indicadas con los siguientes números: 1, glucolisis/ ciclo de Krebs; 2, glutamina sintetasa; 3, glutaminasa; 4, glutamato descarboxilasa (GAD); 5 succinato deshidrogenasa. En el grafico superior (sinapsis de Glutamato; Glu) se hace referencia a los recapturadores de Glu (2 y 7) así como los receptores ionotrópicos (que permiten el ingreso de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, en el componente postsináptico) y metabotrópicos (1,5 y 4,6). En el panel inferior, se observa el papel de metabólico de la glía e inferior a ella, una sinapsis GABAérgica, identificando los transportadores de glutamina (GLN-SA1/2), los receptores GABA<sub>B</sub> (B) y el receptor GABA<sub>A</sub> que permite el ingreso de Cl<sup>-</sup> al componente postsináptico, A la derecha se muestran los iconos utilizados que hacen referencia a los diferentes tipos de receptores para estos neurotransmisores (Tomado y modificado de: Foster *et al*, 2006).

La enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) es fundamental para el control de la excitabilidad neuronal, ya que la disminución de su actividad favorece la aparición de crisis convulsivas (Tapia *et al*, 1971). La GAD está presente en la neurona en dos formas, es codificada por dos genes distintos y se conocen como GAD65 y GAD67 difieren en su distribución, una de ellas es encontrada en las terminales nerviosas y la otra en las mitocondrias de las células gliales, así como en la afinidad con el cofactor fosfato de piridoxal, teniendo la primera mucha afinidad, con actividad rápida y regulada eficientemente, mientras que la segunda posee una débil interacción con el cofactor y es regulada a nivel transcripciones, así que su actividad depende de la excitabilidad neuronal (Herrera, 1986; Paul, 1995; Tapia y Sandoval, 1971).

### 1.3 Recaptura del GABA

El sistema de recaptura tiene como función principal remover el GABA del espacio sináptico después de ser liberado como parte fundamental del proceso de transmisión sináptica, este mecanismo es primordial para la inactivación de su efecto. Tanto las neuronas como las células gliales están encargadas de la recaptura de GABA (Figura 1 panel medio, Foster *et al*, 2006; Olsen, 2000). La activación de los transportadores en las terminales nerviosas, depende del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$ , por lo que es dependiente de la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Olsen, 2000).

El transportador de GABA es una proteína de doce pasos transmembranales se han identificado 4 tipos (GAT 1-4), los transportadores GAT 1 y 4 son los más abundantes en el SNC de los mamíferos, localizados principalmente en las terminaciones nerviosas. El tipo GAT-2 es abundante en la glía y el GAT-3 está altamente expresado en las leptomeninges y en el plexo coroideo. Tiene 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).

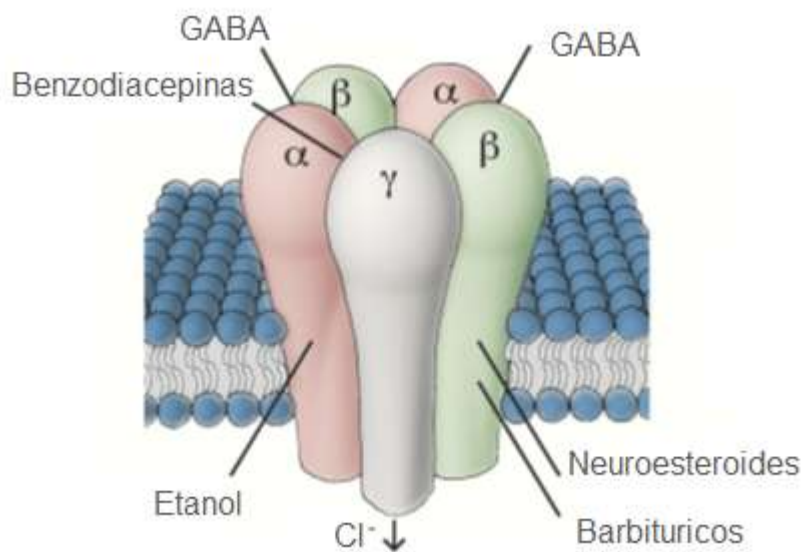
### 1.4 Receptores ionotrópicos: $\text{GABA}_A$ y $\text{GABA}_C$

El receptor  $\text{GABA}_A$  es el sitio de acción de numerosos fármacos con propiedades ansiolíticas (benzodiazepinas), anticonvulsivas, músculo relajantes y sedativas (barbitúricos). Debido a su estructura es parte de una superfamilia canales iónicos activados por ligando, la cual incluye al receptor para acetilcolina (nicotínico), para glutamato (NMDA), para glicina, para serotonina ( $5\text{-HT}_3$ ; Olsen, 2000, Cortés- Romero *et al*, 2011).

El receptor  $\text{GABA}_A$  está compuesto por 5 subunidades distintas que al ensamblarse forman un canal específico para  $\text{Cl}^-$  o  $\text{HCO}_3^-$  (ver figura 2); puede formarse por la interacción de 16 subunidades:  $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ;  $\rho 1-3$



(Parker *et al*, 2006; Olsen, 2000, Cortés- Romero *et al*, 2011). La mayoría de los receptores GABA<sub>A</sub> están compuestos por las subunidades  $\alpha\beta\gamma$ , (en estequiometría 2:2:1 respectivamente), aunque la isoforma más abundante es la  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ . Los patrones de expresión de subunidades y sus combinaciones pueden variar la sensibilidad farmacológica, asimismo las isoformas que se expresan dependen de la zona del cerebro (ver tabla 1).



**Figura 2. Esquema del receptor GABA<sub>A</sub> y los sitios de unión de diversas moléculas.** El receptor GABA<sub>A</sub> es un hetero-pentámero que en su forma más común contiene dos subunidades  $\alpha$ , dos subunidades  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ ; contienen sitios de unión para varios moduladores, como a las benzodiazepinas, el etanol, los neuroesteroides, los barbitúricos y el GABA cuyo sitio de unión es entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . (Imagen tomada y modificada de Olsen, 2000).

El sitio de pegado del GABA se encuentra entre la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ ; este sitio reconocido por análogos estructurales del GABA como el mucimol, la isoguvacina, el THIP (tetrahidroisoxazolo) y DAVA (ácido  $\delta$ -aminovalérico). Esas sustancias activan la apertura del canal con conductancia similar pero diferentes tiempos de vida media, comparados con el GABA, en cambio, la bicuculina, antagonista

competitivo, bloquea las corrientes inducidas por el GABA eliminando la activación del canal de Cl<sup>-</sup>.

Los receptores que contienen a las subunidades rho (p1-3) son conocidos como GABA<sub>C</sub>, sólo han sido encontrados en la retina y poseen propiedades farmacológicas distintas a las del receptor GABA<sub>A</sub>, es decir, que no es sensible a la bicuculina ni al baclofén, ni tampoco a otras drogas afines al receptor GABA<sub>A</sub> como los anestésicos y las benzodiazepinas.

La apertura del canal de Cl<sup>-</sup> relacionado con el receptor GABA<sub>A</sub> permite identificar a través de un análisis biofísico de la corriente del anión que es rápidamente desensibilizada aún en presencia del agonista. Éste es un proceso fisiológico normal, el cual puede ser modulado por diferentes fármacos. Trabajos de Smith y colaboradores han permitido identificar que una desensibilización más rápida farmacológicamente se comporta como el mecanismo inductor de las abstinencias (Smith S *et al.* 2005 y 2007).

### 1.5 Receptor metabotrópico: GABA<sub>B</sub>

El receptor GABA<sub>B</sub> se clasifica como receptor metabotrópico por que tiene una acción lenta y prolongada. Se encuentra principalmente en la membrana presináptica, ahí actúan como autoreceptor, inhibiendo la liberación de GABA; puede jugar el mismo papel en neuronas que liberan otros neurotransmisores (hetero-receptores). Este receptor está asociado con canales iónicos sensibles de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup> involucrando la activación segundos mensajeros.

Tabla1. Ubicación de isoformas y distribución del receptor GABA <sub>A</sub>	
Isoformas GABA <sub>A</sub>	Distribución en el SNC
α <sub>1</sub> β <sub>2</sub> γ <sub>2</sub>	Capa granular del bulbo olfatorio, capa de células polimorfas y región CA3 del hipocampo, interneuronas corticales, globo pálido y núcleos subtalámicos.
α <sub>2</sub> β <sub>3</sub> γ <sub>2</sub>	Bulbo accesorio olfatorio, el estriado, el septum, la capa molecular del giro

	dentado e hipocampo.
$\alpha_2\beta\gamma_1$	Es posible y se sugiere que se exprese en la glía de Bergmann y en núcleos del sistema límbico.
$\alpha_3\beta\gamma_2$	Células monoaminérgicas de varios núcleos cerebrales.
$\alpha_3\theta\epsilon$	Locus coeruleus de la rata.
$\alpha_4\beta\gamma_2$	Tálamo, caudado, putamen y giro dentado.
$\alpha_4\beta_2\delta$	Núcleos talámicos y la corteza cerebral.
$\alpha_4\beta_3\delta$	Células granulares de giro dentado, la corteza cerebral y predominantemente en el estriado.
$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	Neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.
$\alpha_6\beta\gamma_2$ $\alpha_6\beta_2\delta$ $\alpha_6\beta_3\delta$	Células granulares del cerebelo y el núcleo coclear.

**Tabla 1. Isoformas y distribución del receptor GABA<sub>A</sub> en el SNC.** En la columna de la izquierda se presentan las subunidades que componen las diferentes isoformas del receptor GABA<sub>A</sub> a la derecha se expone su distribución en diversas estructuras SNC (Tomada y modificado de: Miguel, 2012).

Los receptores GABA<sub>B</sub> se componen de la subunidad GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub>, a nivel postsináptico, estos receptores se expresan en neuronas GABAérgicas o no GABAérgicas restableciendo el potencial de membrana en reposo.

Debido a la estructura de este receptor no es capaz de reconocer a la bicuculina, la isoguvacina y el THIP, en caso contrario, es activado por el baclofén.

En las células piramidales del hipocampo, la activación del receptor GABA<sub>B</sub> incrementa la conductancia de K<sup>+</sup> sin afectar la conductancia de Ca<sup>2+</sup>. Este hallazgo indica que los receptores y su asociación con los canales dependientes de K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> son distintos en la periferia y en el SNC (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988).

## **1.6 Fisiología del sistema GABAérgico**

Como hemos descrito, el GABA actúa en ambas membranas de la sinapsis. Este aminoácido es acumulado en las vesículas sinápticas con el transportador de aminoácidos (Foster y Kemp, 2006). El efecto a nivel presináptico se observa mediante la activación del receptor GABA<sub>B</sub> y una subsecuente disminución de la entrada de Ca<sup>2+</sup> al botón terminal, generando así una disminución de liberación de neurotransmisores y estabilizando el potencial de membrana en reposo.

La concentración de Cl<sup>-</sup> en el exterior de la célula es 10 a 20 veces mayor (150 mM) que en el interior. La dirección del flujo iónico depende de la fuerza electroquímica, la cual es determinada por el potencial de membrana en reposo y el gradiente de concentración del Cl<sup>-</sup>, así como del potencial de equilibrio del ion. El efecto del GABA se debe a un incremento rápido de la conductancia de Cl<sup>-</sup>, lo cual tiene un efecto hiperpolarizante de la membrana neuronal (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988). En algunas neuronas se fortalece la inhibición con el incremento de la conductancia lenta de K<sup>+</sup> realizando una corriente saliente. Este evento es conocido como potencial posináptico inhibitorio (IPSP) puede ser rápido (menos de 100 milisegundos) o lentos (más de 100 milisegundos).

## **1.7 Sustancias que modulan la actividad del Receptor GABA<sub>A</sub>**

Las benzodiazepinas, como el Dz, son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub> lo que significa que se unen al receptor en un sitio distinto al GABA ejerciendo su acción facilitando la transmisión GABAérgica inhibitoria en la subunidad α del receptor GABA<sub>A</sub>, produce la apertura del canal permitiendo una corriente entrante de Cl<sup>-</sup>. Tienen como principal acción aumentar la frecuencia de apertura del canal, a diferencia de los barbitúricos, como el pentobarbital, que aumentan la duración de apertura del canal.

La picrotoxina es considerada un proconvulsivo, actúa bloqueando al receptor GABA<sub>A</sub> y en consecuencia reduce el ingreso de Cl<sup>-</sup> a la célula. Otros

fármacos como el pentilenetetrazol y la penicilina, son también convulsivantes debido a que bloquean la actividad GABAérgica.

## **1.8 Alteraciones del Sistema GABAérgico**

Dado la gran importancia de la modulación GABAérgica en el control de la excitabilidad neuronal, es válido pensar que esta función es el sustrato fisiológico para el desarrollo de los síndromes de abstinencia. Este tema nos compete y lo tendremos en cuenta para el desarrollo de la tesis.

Muchas condiciones clínicas incluyendo los desordenes psiquiátricos están asociados al desbalance entre la excitación y la inhibición en el SNC, debido a esto uno de los principales objetivos terapéuticos es retornar a ese balance, además de que se ha demostrado que patologías como la epilepsia, ansiedad y la depresión pueden ser causadas por la alteración de este equilibrio (Foster, 2006; Olsen, 2000); el sistema GABAérgico es el objetivo de un amplio rango de drogas en el SNC, incluidos los ansiolíticos, los sedantes, los hipnóticos, algunos anestésicos y los anticonvulsivos.

Se ha asociado la pérdida del tono GABAérgico con el desarrollo y el mantenimiento de la epilepsia en seres humanos, debido a la disminución de la actividad de la enzima que sintetiza GABA (GAD) reduciendo de esta forma el control inhibitorio y propiciando descargas y sincronía de potenciales de acción en la corteza cerebral. Asimismo, el número de terminales axónicas y en consecuencia la densidad procesos de transporte se ven disminuidos en modelos animales con focos epilépticos (Krogsgaard- Larsen, *et al.*1987).

## **1.9 El Síndrome de Abstinencia a GABA**

En el curso de una investigación sobre la relación entre el GABA y la epilepsia (Silva-Barrat *et al.*, 1989), se demostró un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo a la interrupción del tratamiento con GABA en el mandril fotosensible (Fig. 3; Brailowsky *et al.*, 1987; 1988).

En estos monos, la estimulación luminosa intermitente inducía la aparición de descargas epilépticas a nivel de la corteza cerebral acompañadas de mioclonías generalizadas. Mediante cánulas intracorticales, la infusión crónica 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 “mioclónicas” (Brailowsky *et al.*, 1987; 1991).

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

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 (ver la figura 3). Las manifestaciones EEG se presentaban más en 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 (Brailowsky, 1987; 1988; 1989; Will *et al.*, 1988; Fukuda *et al.*, 1987, Montiel *et al.*, 2000).

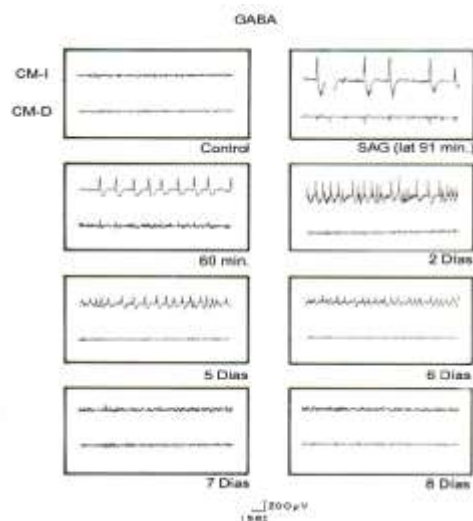
A este fenómeno de hiperexcitabilidad cortical generado por la interrupción de la instilación de GABA, se le llamó “Síndrome de Abstinencia al GABA” (SAG; LeGal La Salle *et al.*, 1988; Silva-Barrat *et al.*, 1992), además de las crisis convulsivas los animales mostraban otros signos clínicos tales como: 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 benzodiazepinas (Dz; Dz) y a barbitúricos (pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modifica la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica del SAG 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. 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 sólo 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 su actividad aproximadamente 40%, tanto en ausencia como en presencia del cofactor, el PLP, a nivel del sitio de infusión con el aminoácido (Salazar *et al.*, 1994).

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



**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 *et al.*, 1995).

La respuesta de estas descargas epileptiformes a los diferentes fármacos anticonvulsivos, administrados por vía sistémica, varía de acuerdo al tiempo de evolución de la actividad paroxística, ya que el foco epiléptico es extraordinariamente resistente a los anticonvulsivos usados clínicamente (fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepina) e incluso el fármaco de elección en casos de estatus epiléptico: el Dz. Lo que vuelve a sugerir



tolerancia cruzada. De tal forma que el SAG es un modelo de epilepsia intratable en los primeros estadios de evolución (Brailowsky, 1991).

A partir del segundo día del SAG se empiezan a observar efectos anticonvulsivos cuando se administran fármacos antagonistas del receptor al NMDA como la ketamina, el amino-fosfonoheptanoato (APH) y el MK-801, o benzodiazepinas como el clonazepam (Brailowsky *et al.*, 1988; 1990; Brailowsky 1991).

En estudios orientados a reproducir *in vitro* este fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal, 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) y por la gran incidencia de epilepsia del lóbulo temporal (psicomotora), debido a esto su estudio es de importancia clínica y experimental.

Se le han descrito al SAG tres distintos patrones en el EEG (Brailowsky *et al.*, 1992):

- **Patrón I:** se presenta actividad espiga-onda única unilateral, de 200 a 700 $\mu$ V de amplitud y a una frecuencia de 0.5-3 Hz.
- **Patrón II:** en él aparecen complejos espiga-onda seguido de poliespigas de alta frecuencia.
- **Patrón III:** en él se encuentran espigas de propagación contralateral (bisincronía), usualmente con mayor amplitud en el lado de la infusión, de varios segundos de duración.

Comúnmente, el SAG se inicia con el patrón I, que predomina a partir del segundo día y hasta el final del Síndrome. Los patrones II y III se observan en las primeras 4 a 6 horas y son raros después de 12 horas de evolución. La aparición de las descargas paroxísticas tiene una latencia promedio de 90 minutos

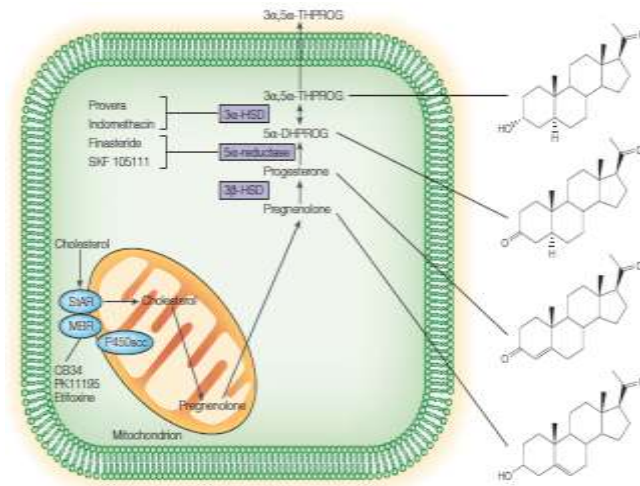
(Brailowsky *et al.*, 1990). En las primeras horas de evolución del SAG, se presenta una resistencia farmacológica a drogas GABAérgicas exceptuando al GABA (Calixto, 2001).

## 2.- Neuroesteroides

La P es un esteroide que puede ser sintetizado por las gónadas y por el cerebro. Los esteroides sintetizados *de novo* en el cerebro reciben el nombre de neuroesteroides (NE; Corpechot *et al.*, 1983), los cuales se diferencian de los esteroides neuroactivos que son sintetizados en la periferia de los órganos estereidogénicos clásicos tales como los ovarios/testículos, las glándulas adrenales, la placenta, el hígado y los huesos (Compagnone y Mellon, 2000; Scharfman y MacLusky, 2006). Los esteroides neuroactivos pueden atravesar la barrera hematoencefálica y tener efectos en el cerebro para regular diversas funciones dentro del sistema nervioso central (SNC; Belleli *et al.*, 2005).

Las enzimas responsables de la síntesis de los NE se localizan tanto en células gliales como en las neuronas, localizadas principalmente en regiones como el hipocampo, la corteza, el hipotálamo y el cerebelo (Compagnone *et al.*, 1995; King *et al.*, 2002; Sierra *et al.*, 2003). La síntesis de NE comienza con la conversión del colesterol a pregnenolona. Esta reacción es mediada por la enzima citocromo P450 (P450<sub>scc</sub>) que realiza una escisión en la cadena lateral, esta enzima se localiza en la membrana interna de las mitocondrias (King y Stocco, 2011; Compagnone y Mellon, 2000). La pregnenolona es el esteroide precursor que origina a los NE que regulan al sistema GABAérgico, entre los cuales se encuentran los pregnanos y los androstános. Los NE que participan en la regulación del sistema GABAérgico son la P y su metabolito reducido la alopregnanolona (AloP), además del neuroesteroide de 19 carbonos como la testosterona y su metabolito, el androstanediol (Fig. 4).

Los NE son los moduladores endógenos alostéricos positivos más potentes que regulan al sistema GABAérgico, la principal neurotransmisión inhibitoria del SNC de los mamíferos. Esta modulación principalmente es a través del receptor GABA<sub>A</sub>. Los NE al igual que otros moduladores como las benzodiazepinas, los barbitúricos y el alcohol permiten una corriente entrante de iones cloruro a la célula (Lambert *et al.*, 2009).



**Figura 4. Biosíntesis de los neuroesteroides.** Se muestra la ruta de síntesis de Alop (3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -HTP) desde el colesterol. La proteína de regulación aguda de la esteroideogénesis (StAR) podría interactuar con el receptor periférico a benzodiazepinas para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial. P450c: citocromo P450, 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -HSD: 3 $\alpha$  ó 3 $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5 $\alpha$ -DHP: 5 $\alpha$ -dihidroP. Tomado de: Belleli y Lambert, 2005.

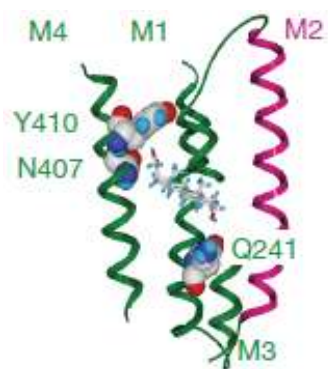
Los NE al igual que las benzodiazepinas y los barbitúricos se caracterizan por tener efectos ansiolíticos, anestésicos, sedativos y anticonvulsivos. Sin embargo, las concentraciones de los NE pueden variar en ciertas condiciones, por ejemplo: un incremento en los niveles de NE se puede deber a estrés, durante el embarazo ó por el consumo de alcohol; en contraste, los niveles de NE pueden disminuir y presentar alteraciones fisiológicas en el sistema GABAérgico durante la angustia, la depresión, la esquizofrenia, la dependencia al alcohol y en casos extremos, la aparición de crisis convulsivas generalizadas (Hosie *et al.*, 2006).

En la búsqueda de reducir los efectos de la ansiedad o la frecuencia en la aparición de las crisis convulsivas, ha llevado al desarrollo de fármacos como los barbitúricos y las benzodiazepinas, sin embargo, el consumo crónico de estas drogas pueden llevar a estados de tolerancia que se puede definir como la reducción en los efectos de una droga eventualmente después de ser administrada en forma repetida y con una misma dosis, esto lleva a un aumento en la dosis del fármaco para obtener el mismo efecto de la droga (Midel, 1981). La dependencia farmacológica es un estado de adaptación producido por un reajuste de mecanismos homeostáticos ante la administración repetida de una sustancia, sin embargo, si hay una interrupción abrupta en la administración de la sustancia después de haber desarrollado estados de tolerancia y dependencia puede llevarse a la aparición de síndromes de abstinencia que favorece la aparición de estados neurológicos caracterizados por cambios en la actividad sensorial-perceptiva, alucinaciones y en casos extremos, crisis convulsivas. Diversas evidencias experimentales y clínicas muestran que: si los niveles de P disminuyen rápidamente después de un incremento crónico, puede inducir la aparición de síndromes de abstinencia a este esteroide, estas fluctuaciones tendientes a la reducción de P lleva a la inducción de crisis convulsivas en periodo progestacional que puede dar paso a la epilepsia catamenial (Gangisetty *et al.*, 2010). Esta aparición de síndromes de abstinencia y focos epileptogénicos, es similar a las presentadas por la abstinencia a drogas como las benzodiazepinas y al mismo neurotransmisor GABA (Brailowsky *et al.*, 1988 y Ward *et al.*, 1998).

En el campo de las neurociencias es necesario el desarrollo de nuevos modelos de abstinencia en animales que permitan entender los mecanismos que se modifican en la neurotransmisión GABAérgica y que a su vez estos sean modificados por la acción directa de los NE sobre el receptor GABA<sub>A</sub>. Este uno de los principales objetivos de la presente tesis.

## 2.1 Mecanismos de los neuroesteroides

La P a través de la Alop potencia las corrientes de Cl<sup>-</sup> debido a que es un modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub> (Harrison *et al.*, 1987; Majewska *et al.*, 1986; Lambert *et al.*, 2003). Este neuroesteroide tiene sitios de unión específicos en el receptor GABA<sub>A</sub> que son distintos a los sitios de unión que poseen las benzodiazepinas, los barbitúricos, el alcohol y su propio neurotransmisor GABA (Gee *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1989; Lambert *et al.*, 2003). Aunque el mecanismo exacto de cómo los neuroesteroides interactúan con el receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub> no es muy claro, se han identificado dos sitios de unión transmembranales que regulan la potenciación y directa activación de los efectos de los neuroesteroides (Fig. 5; Hosie *et al.*, 2006). Así se ha podido determinar que los neuroesteroides como la Alop pueden realizar dos acciones por separado a través del receptor GABA<sub>A</sub>: 1) pueden potenciar las corrientes de Cl<sup>-</sup> en presencia de GABA y 2) activar directamente el receptor GABA<sub>A</sub> a concentraciones que van de 2-4 nM (Hosie *et al.*, 2006; Rapkin *et al.*, 1997; Belleli *et al.*, 2002). Aunque los neuroesteroides pueden modular los receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos y extra-sinápticos, su acción moduladora se ve favorecida por los receptores extra-sinápticos con aquellas isoformas que contengan la subunidad δ (Herd *et al.*, 2007).



**Figura 5. Sitios de unión de los neuroesteroides en el receptor GABA<sub>A</sub>.** Se muestran los dominios M1 y M4 transmembranales donde a través de los residuos Y410, N407 y Q241 se unen los neuroesteroides. (Tomado de Hosie *et al.* 2006).

## **2.2 Síndrome de Abstinencia a Progesterona (crónico)**

Modelos animales de abstinencia a P tienen un papel fundamental para la caracterización y entendimiento de la fisiopatología de las epilepsias catameniales y el estudio de las crisis convulsivas derivado por un incremento agudo y disminución súbita de P.

Recientemente se han descrito modelos de síndrome de abstinencia a P en animales. La primera de ellas intenta simular la fase lútea de ratas hembras, que es la fase del ciclo del estro donde se encuentra el máximo incremento de P por medio de la administración crónica de este esteroide sexual, seguido de un rápido decremento en los niveles de la P debido a la presencia de finasterida que es un inhibidor de la biotransformación de P a su metabolito Alop (Smith *et al.*, 1998<sup>a</sup>; Moran y Smith, 1998; Reddy *et al.*, 2001). Un segundo modelo es a través de la ovariectomización (extraer ovarios en ratas hembras) después de una exposición crónica de P (Frye *et al.*, 1998; Frye y Bayons, 1998).

La P es un neuroesteroide que modula al receptor GABA<sub>A</sub>, es lógico plantear que la privación de este NE induce la aparición de síndromes de abstinencia.

## **2.3 Bases moleculares de la abstinencia a Progesterona**

La exposición crónica de P (o Alop) induce una *down-regulation* de la subunidad  $\gamma 2$  y una *up-regulación* de la subunidad  $\alpha 1$ , que consecuentemente resulta en alteraciones de la composición de los receptores GABA<sub>A</sub> y que impactan directamente en la farmacología del receptor (Yu *et al.*, 1996; Brussard *et al.*, 1997; Concas *et al.*, 1998; Foley *et al.*, 2003). La abstinencia a P induce hiperexcitabilidad neuronal y *up-regulation* de la subunidad  $\alpha 4$  (Gulinello *et al.*, 2003; Gulinello *et al.*, 2001; Smith S *et al.* 1995, 2007). Se ha sugerido que el

incremento en la susceptibilidad de inducir crisis convulsivas durante la abstinencia a P ha sido asociado a cambios en las propiedades biofísicas del receptor GABA<sub>A</sub> por el incremento de la subunidad  $\alpha 4$  (Hsu y Smith, 2003; Smith *et al.*, 2007). Las propiedades que posee la subunidad  $\alpha 4$  son: 1) insensibilidad farmacológica para la unión con benzodiazepinas, 2) se co-ensambla con las subunidades  $\gamma 2$  o  $\delta$  y 3) acelera la desensibilización de las corrientes de Cl<sup>-</sup> (Sur *et al.*, 1999). Así, el incremento en la expresión de la subunidad  $\alpha 4$  reduce la inhibición mediada por los receptores GABA<sub>A</sub> y promueve un aumento en la susceptibilidad de inducir crisis convulsivas e hiperexcitabilidad neuronal.

### **3. Adicción, Tolerancia y Dependencia**

Desde tiempos muy remotos las sociedades han consumido sustancias que alteran el estado de ánimo y el funcionamiento cognoscitivo, por ejemplo: el café, el alcohol, el tabaco, la marihuana, la cocaína, las anfetaminas, los alucinógenos. Algunas de ellas han sido creadas con fines terapéuticos; sin embargo, en ciertos 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.

Los fármacos creados con fines terapéuticos son utilizados para disminuir el dolor, asimismo, las sustancias usadas como drogas de abuso tienen como objetivo generar un efecto placentero, ambas a largo plazo, pueden generar síntomas y estados desagradables, características de los estados de tolerancia y dependencia (Brailowsky, 1991; 2000).

La tolerancia farmacológica se desarrolla tras la administración repetida de una droga a la misma dosis sin producir el mismo efecto que la primera vez por lo que se requiere aumentar la dosis (Brailowsky, 1991; 2000). Normalmente, conforme se aumenta la dosis de un fármaco, su efecto observado es mayor. Sin embargo, después de dosis repetidas se requiere de dosis cada vez más altas para obtener el efecto logrado en la primera exposición (desviación a la derecha de la curva dosis-efecto).

Existen diversas definiciones de la tolerancia, las cuales incluyen el evento fisiológico y el psicológico, estos son: tolerancia farmacocinética, tolerancia farmacodinámica y tolerancia condicionada.

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 inducido por los barbitúricos y benzodiazepinas, ya que estimulan la producción de enzimas microsomales en el hepatocito, con la consecuente biotransformación y catabolismo rápido de los barbitúricos de la circulación (McLellan *et al.*, 1992).

La tolerancia farmacodinámica, funcional o de tipo celular, da como resultado la expresión del cambio en el número de receptores (*up (incrementando)/down (reduciendo) 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 (cambios en las vías de señalización, interacción con el genoma y cambios transcripcionales, favorecer la desensibilización; Feldman *et al.*, 1996).

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 (Lader y File, 1987).

La tolerancia condicionada implica la asociación de un contexto, físico o social con el consumo y efecto de una droga, después del uso prolongado de la misma en esas condiciones, el contexto de uso promueve de forma gradual una serie de respuestas del organismo que tienen como finalidad contrarrestar los



efectos de la sustancia, generando un estado menor de sensibilidad a la droga (Redolar, 2008).

La dependencia física es un estado de alteración producido por la administración de una droga, es decir que la droga afecta múltiples sistemas que antes estaban en equilibrio, al restablecerse el equilibrio se genera un estado de alostasis. La dependencia psicológica es una condición en la cual la droga produce un sentimiento de satisfacción que requiere una administración periódica o continua para producir placer y evitar el efecto conductual desagradable (Brailowsky, 1991; 2000), acompañada de un aumento en el consumo, el cual está aunado en invertir más tiempo en la búsqueda y obtención de la droga, lo que da como resultado disminución y descuido de actividades laborales y sociales así como daños físicos y psicológicos.

La prueba clínica de la dependencia física es la aparición del “síndrome de abstinencia” cuando la droga ha dejado de administrarse, su amplitud y duración depende de las variables farmacocinéticas. Cada tipo de sustancia conlleva síntomas característicos que suelen ser contrarios a los efectos del fármaco, se necesita continuar con la administración de la droga para evitar los síntomas adversos y no por el placer que la ingesta de la droga produce por sí misma.

Tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia son fenómenos biológicos que resultan como consecuencia natural del consumo y retiro abrupto 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, aunado a que el receptor  $GABA_A$  tiene afinidad por gran cantidad de sustancias cuyas propiedades los hacen capaces de generar estados como los descritos anteriormente.

## 4. Benzodiacepinas y farmacología del Diazepam

### 4.1 Abstinencia a Benzodiacepinas

En 1955, Sternbach sintetizó el clordiazepóxido, el patrón de acciones de este fármaco fue descrito por Randal (ver Martín, 1987). Pero fue hasta 1961 cuando el clordiazepóxido fue introducido en la clínica con el nombre de “librium”, marcando con ello el comienzo de la era de las Bzs (Sternbach, 1979). Hasta la fecha se han sintetizado más de 3000 compuestos relacionados con las benzodiacepinas, 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 utilizan se han seleccionado por su alto potencial ansiolítico, capacidad de sedación, efectos anticonvulsivos y de relajación muscular, estos efectos se explican por su función depresora de la actividad del SNC (Shader y Greenblatt, 1981; Mark y Waltzman, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007). Las Bzs son fármacos que incrementan la actividad del receptor GABA<sub>A</sub>, ejerciendo una modulación alostérica positiva (Shader y Greenblatt, 1981; Llorente *et al.*, 2000). La unión entre las Bzs y el receptor GABA<sub>A</sub> tiene como resultado un incremento de las conductancias de Cl<sup>-</sup>. Esta facilitación de las conductancias de Cl<sup>-</sup> son inducidas por GABA (Squires, 1983; Mark y Waltzman, 1999). Los receptores GABA<sub>A</sub>, que contienen las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ó  $\alpha 5$  en combinación con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma 2$ , constituyen a los receptores más abundantes en el cerebro, los receptores con expresión de las subunidades  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$ , no responden clínicamente al Dz, flunitrazepam, clonazepam y zolpidem (Pirker *et al.*, 2000; Mohler, 2006). El efecto anticonvulsivo, sedativo, ansiolítico o hipnótico de las Bzs es mediado por los receptores GABA<sub>A</sub> cuya conformación se basa principalmente en las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . (Mohler *et al.*, 2002; Mohler, 2006).

El fenómeno de disminuir la actividad del cerebro ocurre de manera dependiente de la dosis de Bzs. Los efectos que inducen son: sueño, pérdida del conocimiento, anestesia, coma y depresión de la actividad respiratoria y cardíaca. 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).

Tratamientos prolongados con estos fármacos pueden provocar tolerancia, dependencia física y psicológica. Es común el incremento paulatino de la dosis por la disminución del efecto durante tratamientos prolongados con Bzs.

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

Los signos y síntomas más comunes de la abstinencia a las Bzs son la ansiedad y 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 Martín, 1996). Es difícil distinguir entre los síntomas de la abstinencia y la reaparición de la ansiedad que motivo la prescripción de las Bzs.

Diversos estudios indican que tratamientos largos con Bzs disminuyen significativamente la expresión de las isoformas  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$  del receptor  $GABA_A$ . 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).

## 4.2 Farmacología del Diazepam

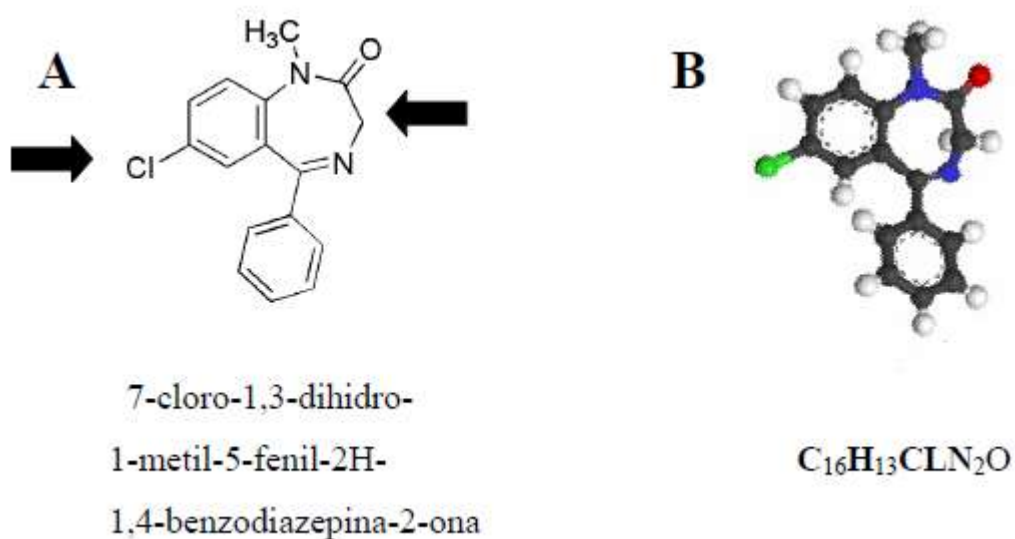
El Dz es la Bzs mas utilizada en el ámbito clínico a nivel mundial (Manchikanti *et al.*, 2002; Alvarenga *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007), esta Bzs se utiliza en tratamiento para el manejo farmacológico de la ansiedad, la psicosis (Misztal-Dethloff *et al.*, 2005) y el insomnio, además es utilizado como tranquilizante (Alvarenga *et al.*, 2007), anestésico, hipnótico (Manchikanti *et al.*, 2002) y produce una marcada relajación muscular.

Se ha demostrado que la actividad registrada en el EEG, después de la aplicación de Dz, presenta un incremento en la actividad de ondas beta y un decremento de la actividad de las ondas alfa, estos cambios en las ondas beta han sido correlacionados con su efecto anticonvulsivos (Mandema y Danhof, 1992; Jongasma *et al.*, 2000). La administración del Dz en el hombre incrementa los niveles de testosterona en el plasma y de corticosterona en las ratas, además en células glomeruladas adrenales bovinas inhibe la producción de aldosterona (Papadopoulos, 1993).

La síntesis del Dz se realizó en 1959 por los laboratorios Roche, y su ingreso al mercado comercial fue en 1963. Es un derivado de la 1-4 benzodiazepina, con nomenclatura IUPAC 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona, cuya fórmula empírica es  $C_{16}H_{13}ClN_2O$  (Fig. 6; Mathey, 1965), su peso molecular es 284.75 kDa. Tiene un efecto menos tóxico y diez veces más potente que el librium (Sternbach, 1979). La introducción en México del Dz fue hasta el año de 1968.

De acuerdo al criterio de la convención de Substancias Psicotrópicas de la Organización Mundial de la Salud en 1971, el Dz pertenece al grupo IV de fármacos controlados, este grupo denota sustancias cuya probabilidad de establecer abuso es pequeña pero significa un riesgo de abuso para la salud pública

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; Manchikanti *et al.*, 2002).



**Figura 6. Estructura química del Dz.** En A se muestran los tres anillos básicos de la Bz: marcados con flechas un hexano nitrogenado con un grupo ceto, un anillo bencénico clorada (Cl); y un grupo hexano. En B, el esqueleto de carbonos en forma tridimensional.

#### 4.3 Farmacodinamia y farmacocinética del Diazepam

Una característica importante del Dz es su rápida acción dentro del organismo, por vía oral e intravenosa los efectos comienzan en cuestión de minutos, alcanzando de 1 a 1.5 h el pico máximo en las concentraciones del plasma sanguíneo, este rango puede variar dependiendo de la edad, la alimentación y de la vía de administración, ya que por vía intramuscular es más lenta. Las proteínas del plasma distribuyen al Dz y sus metabolitos, los cuales pasan la barrera hematoencefálica y la placenta. La disminución de las concentraciones en el plasma después de la administración oral es bifásica (Dhillon *et al.*, 1982).

Esta Bz comienza a ser metabolizada por una N-desmetilación realizada por los citocromos P-450, P-3A4 y P2C19 que se encuentran principalmente en el hígado, el N-desmetilDz es el metabolito farmacológicamente más activo, después es hidroxilado por el citocromo P-3A4 formando el metabolito activo, temazepam, al final ambos metabolitos son convertidos en oxazepam y son eliminados excretándose principalmente como conjugados glucorónicos por la orina (Goodman *et al*, 1996; Shader y Greenblatt, 1981; Olkkola y Ahonen, 2008).

La vida media del Dz es relativamente larga (24 a 48 h), pero sus metabolitos activos pueden permanecer en la sangre o en el cuerpo por algunos días e incluso semanas (Shader y Greenblatt 1981).

Durante tratamientos prolongados con Dz se genera tolerancia farmacocinética, ya que esta Bz durante la primera aplicación induce síntesis *de novo* del citocromo P-450 a nivel hepático, el cual facilita la tasa de biotransformación, que disminuye la actividad y la disponibilidad del fármaco, por tal motivo en las siguientes aplicaciones se requiere una dosis mayor para alcanzar el efecto deseado (Goodman *et al*, 1996).

#### **4.4 El síndrome de abstinencia a Diazepam**

En la década de los 70's en los EUA se reportaron varios casos en los cuales la interrupción abrupta de un tratamiento prolongado con Dz producía un síndrome de abstinencia caracterizado por: un exagerado nivel de ansiedad, insomnio, sudoración profusa, pesadillas, disforia, agitación, inestabilidad emocional, temblor, dolor de cabeza, vértigo, falta de coordinación motora, hipersensibilidad sensorial, letargo, fatiga, visión borrosa, sensación facial ardiente, dolor muscular, taquicardia, alucinaciones, psicosis, delirio y en ocasiones convulsiones. (Greenblatt y Shader, 1978; Shader y Greenblatt, 1981; Petursson y Lander, 1984; Lander, 1994; Doble y Martin, 1996; Mark y Waltzman, 1999; Baptista *et al.*, 2007).

#### 4.5 Modificaciones EEG y moleculares en la abstinencia a Diazepam

Se sabe que el retiro abrupto de la administración de Dz en humanos altera la actividad cortical registrada a través del EEG, este evento es una consecuencia del incremento en la excitabilidad neuronal que comúnmente se asocia con ansiedad. Durante la abstinencia de Dz, los cambios EEG se caracterizan por la disminución de las ondas de baja frecuencia durante el sueño. Resulta paradójico que en la práctica clínica médica, el Dz es utilizado como auxiliar en el tratamiento para el Síndrome de Abstinencia al alcohol (Vicens *et al.*, 2006).

En ratas, la interrupción de tratamiento prolongados con Dz genera la aparición de irritabilidad, conductas de miedo y crisis convulsivas; además de cambios moleculares en el receptor GABA<sub>A</sub> tales como: la disminución de la densidad de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  además de un incremento en la expresión del RNAm de las subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\gamma 2L$ ,  $\gamma 2S$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  en neuronas de la corteza cerebral y el hipocampo (Impagnatiello *et al.*, 1996; Pesold *et al.*, 1997), estos cambios modifican la función farmacológica del receptor provocando la reducción del efecto del Dz y del propio GABA (Follesa *et al.*, 2001; 2003; 2004). Sin embargo, en la búsqueda de nuevas alternativas para estudiar el origen de las abstinencias a Bzs, recientemente se ha demostrado que el sistema glutamatérgico también se encuentra modificado como parte del proceso de génesis de la abstinencia a Dz. Durante la abstinencia a Dz, hay cambios en la conformación de los receptores para glutamato, estos cambios son asociados con un incremento tanto en el número como en la función de los receptores AMPA y una reducción (*down-regulation*) de los receptores NMDA. El incremento en la función del receptor AMPA esta correlacionado con la sobre-expresión de la subunidad Glu1 (subunidad esencial para la plasticidad neuronal; Izzo *et al.*, 2001; Allison *et al.*, 2005). Se ha cuantificado que dependiendo de la forma de administración del Dz en un tratamiento, los cambios en la abstinencia son paradójicamente diferentes, ya que la administración vía IP provoca en la

abstinencia una reducción de la tasa del pegado en el receptor AMPA, es decir *down-regulation* de este receptor, caso contrario con la administración subcutánea, en este modelo incrementa la tasa de unión al mismo receptor AMPA, este efecto puede ser una respuesta neuroadaptativa hacia un incremento en la actividad excitatoria (Allison y Pratt, 2006; Steppuhn y Turski, 1993).

En la presente introducción se ha descrito el sustrato biológico en el cual se basó la estrategia experimental de esta tesis. La descripción del sistema GABAérgico nos permite identificar que este sistema de neurotransmisión, el principal inhibidor del cerebro, cuando se incrementa y en forma abrupta se reduce su función genera un síndrome de abstinencia. Moléculas endógenas como los NE, y fármacos como las Bzs tienen en común la capacidad de inducir cambios moleculares y fisiológicos en la neurotransmisión GABAérgica, sin embargo, no conocemos el efecto electrofisiológico de la aplicación directa de P al cerebro. ¿Es posible que la instilación-interrupción intracortical de P genere en la misma proporción el incremento de la excitabilidad neuronal como lo realiza el GABA y las Bzs? Reconocer esto será una pieza clave en el campo de las neurociencias para futuras investigaciones sobre las cuales se puedan basar estrategias farmacológicas para revertir estos mecanismos sinápticos que tienen en común las abstinencias.



## **5. Justificación**

Estudios clínicos y experimentales han mostrado que la P tiene influencia profunda en la regulación de la excitabilidad neuronal, en la susceptibilidad de crisis convulsivas y en la epilepsia catamenial. Lo anterior se resume en un problema de salud pública que afecta a mujeres y hombres lo que ha llevado al desarrollo de terapias farmacológicas para contrarrestar los efectos de estos padecimientos, sin tener hasta el momento una terapia eficaz para poder manejar este problema. No se conoce si la administración intracortical de P y su interrupción súbita puede inducir un síndrome de abstinencia. Por tal motivo la justificación de este trabajo es desarrollar un modelo que muestre las alteraciones electrofisiológicas en la neurotransmisión GABAérgica por la interrupción de administración y abstinencia a P.

## 6. Objetivos

1.- Identificar el incremento en la excitabilidad neuronal en el EEG de la corteza cerebral somatomotora a través de un análisis de potencia y frecuencia que caracteriza al síndrome de abstinencia a P (SAProg) por inducción aguda.

2.- Caracterizar el SAProg de inducción aguda y comparar sus características EEG con otros síndromes de abstinencia como: el síndrome de abstinencia a GABA (SAG), el síndrome de abstinencia a Dz (SAD) y el síndrome de abstinencia a P inducida en forma crónica (SAProg crónico).

## 7. Hipótesis

***1. La interrupción repentina de la administración-aguda intracortical de P, inducirá la aparición de hiperexcitabilidad neuronal, cuantificada por el incremento en la potencia y frecuencia del EEG.***

***2. La manifestación EEG de la abstinencia aguda de P presentará una mayor excitabilidad neuronal que la inducida por GABA y por el Dz***

## 8. Material y Métodos

### 8.1 Sujetos

Se utilizaron 27 ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g) proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente (INPRF), en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25°C), agua y alimento *ad libitum*, con un ciclo de luz oscuridad invertido (10 am - 22 pm oscuridad; 22 pm - 10 am luz) y de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Academia Nacional de Medicina (1999); en todos los procedimientos experimentales se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales. Los sujetos de experimentación fueron alojados en cajas de acrílico transparentes, fueron mantenidos en cajas individuales y permanecieron así hasta el final del procedimiento. Cada uno de los experimentos fue realizado durante el ciclo de oscuridad de las ratas macho.

### 8.2 Sustancias

- Antibiótico (bencilpenicilina Benzatinica, antibióticos de México, S.A. de C.V).
- Antiséptico (Microcyn, Oculus Technologies de México).
- GABA (Sigma-Aldrich, St Lois, MO U.S.A).
- Lidocaína con epinefrina (265 Laboratorios PiSA de México).
- Pentobarbital sódico (Sedalphorte, Salud y Bienestar Animal de México).
- P (Sigma-Aldrich, St Lois, MO U.S.A).
- Resina Acrílica (Nic Tone Cross Linked, mdc dental México).

### **8.3 Cirugías Estereotáxicas**

Se realizaron cirugías estereotáxicas para poder registrar la actividad cortical eléctrica en el EEG inducidos por los diferentes síndromes de abstinencia. Esta preparación electrofisiológica permite la adquisición de la señal eléctrica por separado de ambos hemisferios cerebrales. Los animales resultan ser su propio control ante cualquier modificación sináptica, es decir, que la obtención del registro EEG control se realiza a cualquier manipulación farmacológica y sobre esta señal se hacen las comparaciones y análisis cuantitativo de potencia y frecuencia que inducen los síndromes de abstinencia. Las cirugías se realizaron en animales anestesiados con pentobarbital sódico (30mg/Kg de peso; Pisabental®) a los cuales se les colocaron cánulas/electrodos y electrodos de acero, en ambos hemisferios craneales; al grupo del SAG, al grupo experimental SAProg y el grupo del vehículo se les colocaron 2 cánulas de infusión intracortical mediante el sistema estereotáxico (STOELTING®) con las siguientes coordenadas debidamente estandarizadas para todos los animales: 1.5 mm de profundidad, 2 mm posterior a bregma, 2.5 mm de la línea media. Asimismo, se colocaron 3 electrodos en el cráneo (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre, dos de registro 4 mm posterior a bregma y uno de referencia sin actividad anterior a bregma) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998). Posterior a cada cánula, se implantó un electrodo epidural de registro EEG. El complejo cánulas-electrodos-conector se fijó al cráneo con cemento acrílico. Se suturó la piel y finalmente se administró 1,200 000 U de bencilpenicilina benzatínica.

Los grupos experimentales SAD y SAProg crónico se les realizó de la misma manera la cirugía estereotáxica, pero con la diferencia que en lugar de

implantar cánula de instilación, se implantaron únicamente electrodos epidurales en la región parietal del cráneo.

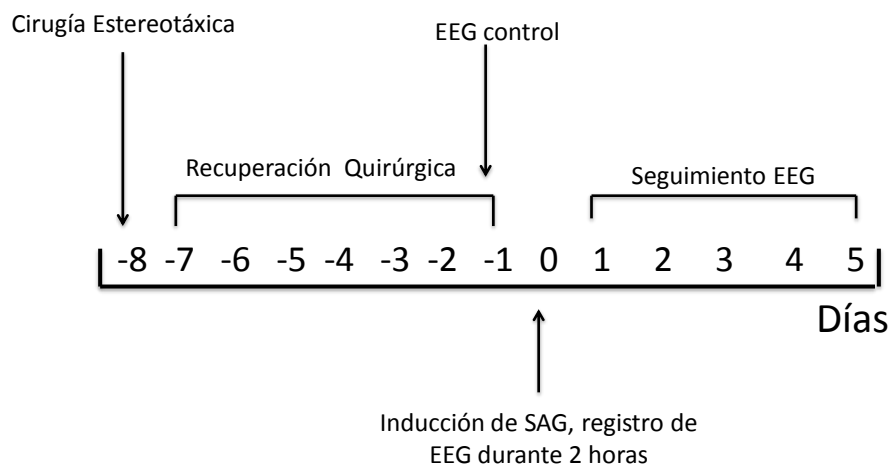
Después de la cirugía estereotáxica a los sujetos de experimentación se les permitió tener una semana de recuperación quirúrgica antes de proceder a la experimentación con ellos.

#### **8.4 Registro EEG**

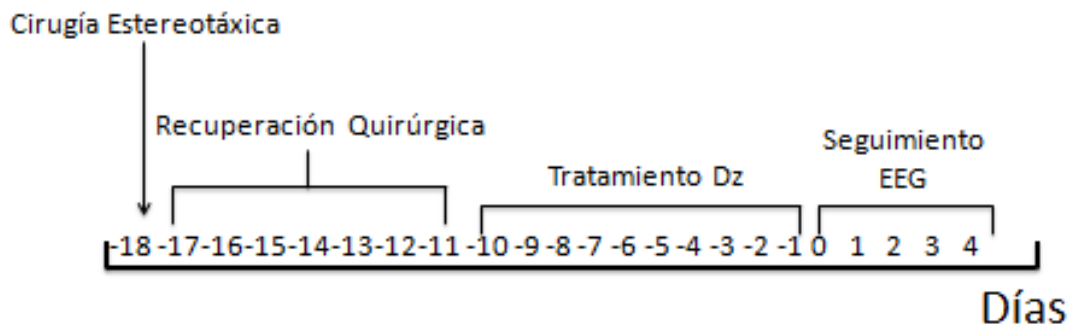
La señal EEG derivada del registro de las regiones fronto-parietales de cada animal que corresponden al área somato sensorial del cerebro de la rata, se realizó mediante un cable de registro (5 terminales faradizadas adaptadas a conexión directa con amplificadores P511 Grass). Amplificación 20; filtros de frecuencia baja 3 Hz/1000 y frecuencia alta 0.3 KHz. La señal fue adquirida con el programa Poliview 8 (National Instruments) en una computadora y analizados con el sistema ach4dq mediante el uso de filtros digitales de 0-40 Hz y eliminación de saturación. Se realizó conteo de espigas y análisis de bandas de frecuencia con el uso del espectro de frecuencia de Wavelets.

## 8.5 Procedimiento Experimental

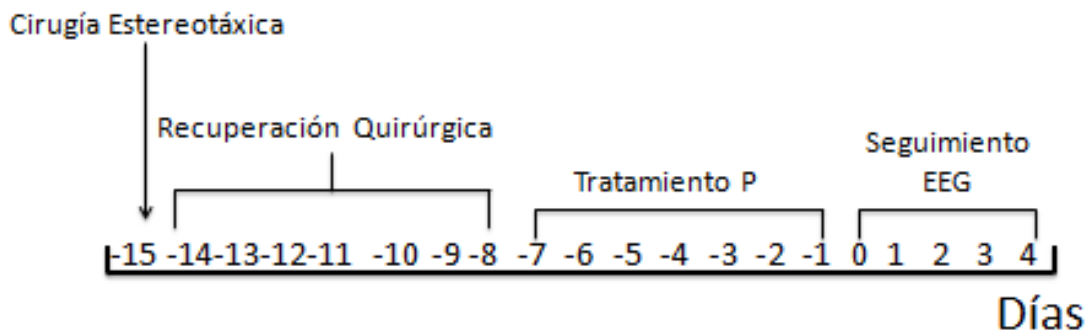
**8.5.1 Grupo SAG.** A este grupo de animales (n=5) después de una semana de la cirugía estereotáxica se les realizó un EEG control y se les indujo hiperexcitabilidad neuronal tras el retiro abrupto de instilación intracortical de GABA (5 mM; 6  $\mu$ l/2h) en la corteza somatomotora derecha, inmediatamente después se obtuvo el registro EEG durante 2 h y se les realizó un seguimiento de registro EEG durante 5 días.



**8.5.2 Grupo SAD.** Este grupo de animales (n=5) después de ser operados por estereotaxia para implantarles electrodos epidurales de registro EEG, se les permitió tener una semana de recuperación, a la semana se les realizó un EEG control. Al día siguiente se inició un tratamiento crónico durante 10 días de la administración de Dz vía i.p (7 mg/Kg), se interrumpió la administración de Dz y se realizó seguimiento EEG durante 5 días.

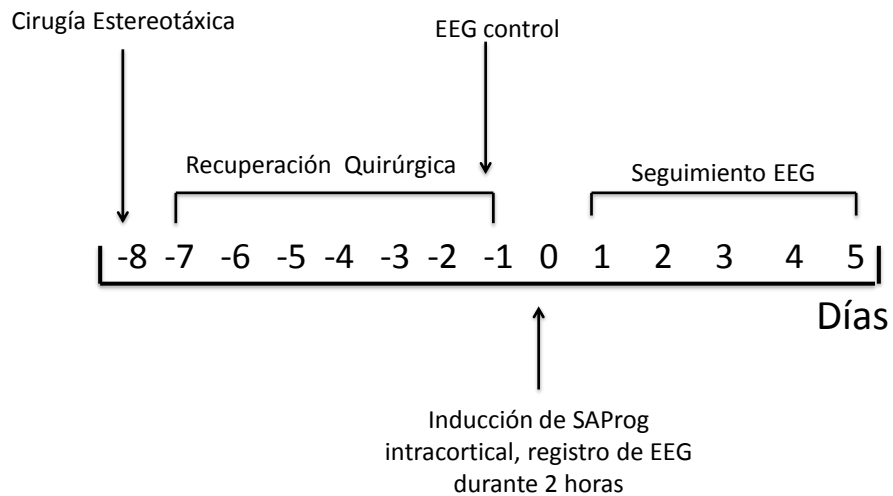


**8.5.3 Grupo SAProg crónico.** Para este grupo experimental (n=5) después de ser operados por estereotaxia para implantarles electrodos epidurales de registro EEG, se les permitió tener una semana de recuperación, a la semana se les realizó un registro EEG en condiciones basales. Al día siguiente se inició un tratamiento crónico durante una semana de administración de P (s.c; 30 mg/Kg), se interrumpió el tratamiento al día 7 de P y se realizó seguimiento EEG durante 5 días.

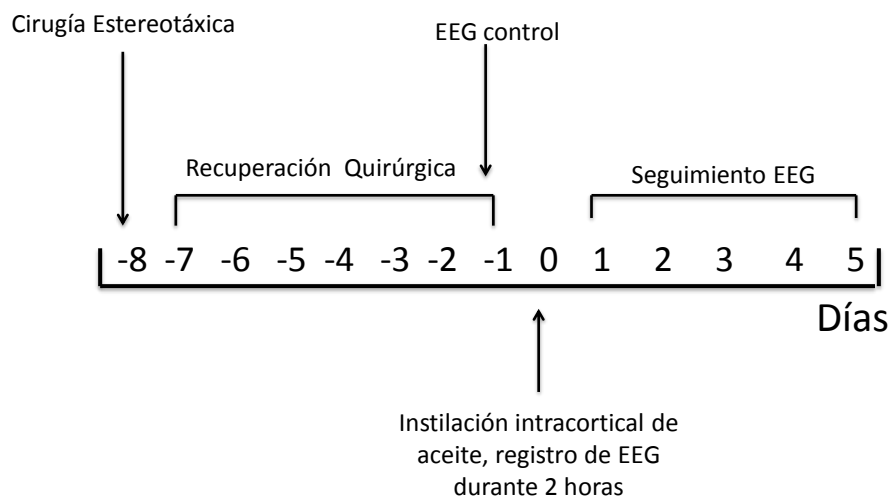




**8.5.4 Grupo SAProg intracortical.** A este grupo de animales (n=7) después de ser operados por estereotaxia para colocarles el complejo cánulas/electrodos, se les permitió tener una semana de recuperación, a la semana se les realizó un EEG control. Al día siguiente se les indujo hiperexcitabilidad neuronal tras el retiro abrupto de instilación intracortical de P (5 mM; 6  $\mu$ l/2h) en la corteza somatomotora derecha, inmediatamente después se obtuvo el registro EEG durante 2 h y se les realizó un seguimiento de registro EEG durante 5 días.



**8.5.5 Grupo control-vehículo.** Este grupo semejante a los anteriores (n=5) después de ser operados los animales por estereotaxia para colocarles el complejo cánulas/electrodos, se les permitió tener una semana de recuperación, a la semana se les realizó un registro EEG control. Al día siguiente se les instiló intracorticalmente aceite (vehículo para disolver a la P; 6  $\mu$ l/2h) en la corteza somatomotora derecha, inmediatamente después se obtuvo el registro EEG durante 2 h y se les realizó un seguimiento de registro EEG durante 5 días.



## 8.6 Análisis Estadísticos

Los resultados electroencefalográficos de los diversos grupos se cuantificaron mediante el conteo del número de complejos espiga-onda y cambios en la potencia del EEG mediante el análisis de frecuencia de Wavelets. El análisis estadístico para contrastar las diferencias entre los grupos fue mediante las pruebas de ANOVA de una vía intra-grupos y una ANOVA de dos vías inter-grupos haciendo una comparación entre grupos con un valor de  $p \leq 0.05$  con una prueba Post Hock: Tukey.

## **9. RESULTADOS**

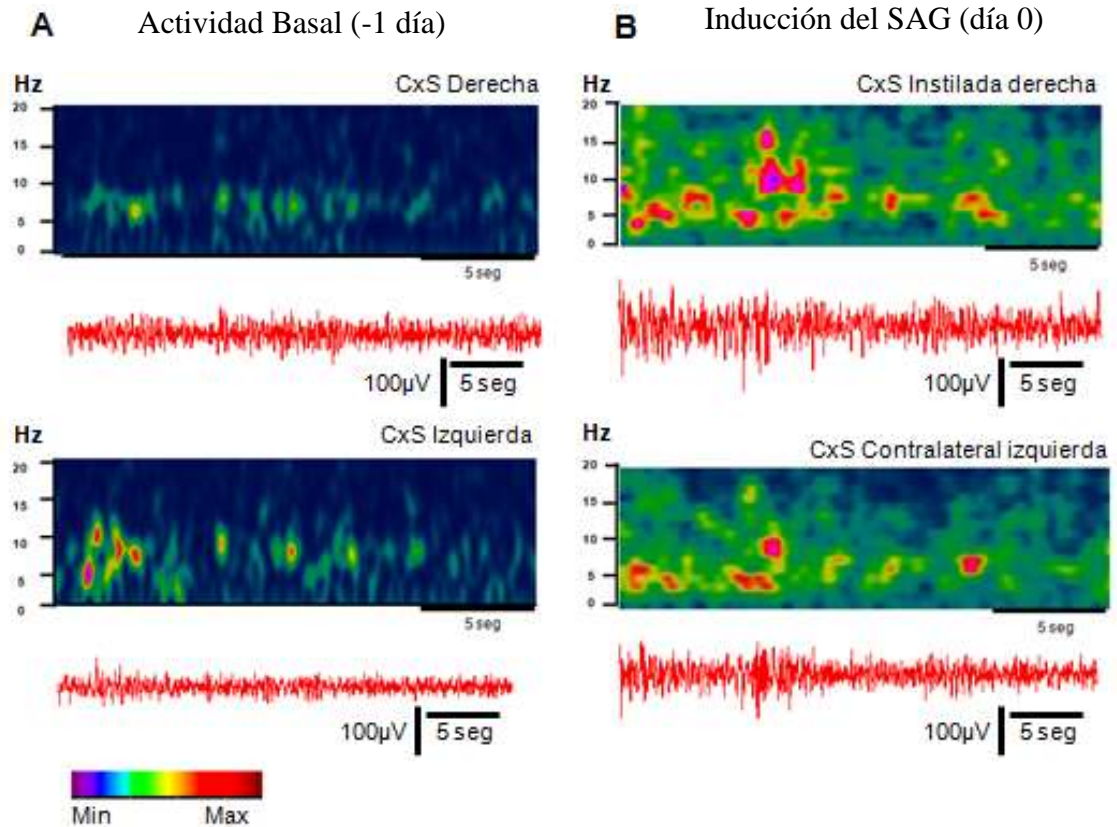
### **9.1 Modificaciones de la excitabilidad cortical inducido por la abstinencia a GABA (SAG)**

Para identificar a través del registro electroencefalográfico (EEG), la hiperexcitabilidad neuronal de la corteza somatomotora (CxS, derecha) que caracteriza a la abstinencia a GABA y contrastar con otras abstinencias, los cambios en la actividad cortical consecuencia de la abstinencia a GABA, fueron cuantificados mediante el análisis de los complejos espiga-onda y espectro de potencia.

#### **Condiciones EEG Basales**

En el registro EEG control, en un periodo de 30 min se identificó un patrón de ondas rápidas de baja amplitud. El análisis cuantitativo de Wavelets identificó que en la banda de frecuencia corresponde a un espectro de 7 Hz, tuvo una amplitud promedio de  $312 \pm 61 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , la manifestación espectral en color de esta actividad cortical basal fue representada en colores azules-verdes en la gráfica del espectro (Fig. 7.A). El análisis electrofisiológico indicó que no hubo actividad espiga-onda o cambios de amplitud o frecuencia (día -1) en la corteza cerebral (Fig. 7.A y Fig.8). Ambas cortezas (CxS, der. e izq.) mostraron simetría en la amplitud y en la frecuencia de su actividad del EEG basal, los animales que no cumplieron con este criterio fueron descartados del presente estudio.

## Espectros de frecuencia y análisis de registros EEG del SAG



**Figura 7. Síndrome de abstinencia a GABA (SAG) en rata.** A-B Espectros de frecuencia y registros electroencefalográficos representativos de un animal con actividad cortical en condiciones basales (panel de la izquierda) y con manifestaciones de hiperexcitabilidad neuronal como resultado de la interrupción de la instilación intracortical de GABA (panel de la derecha). (A) Espectro de frecuencia de actividad cortical basal con predominio del color azul, que corresponde al registro EEG control de la corteza CxS derecha (registro inferior). Debajo de esta secuencia se muestra la actividad de la CxS izquierda en orden semejante. (B) Espectro de frecuencia que refleja un aumento en la potencia que se manifiesta con la aparición de bandas de color rojo entre 5-15 Hz (Max, barra inferior izquierda), se identificó la aparición de los complejos espiga-onda. Nótese que la máxima actividad cortical se encuentra en la CxS instilada derecha.

### Inducción del síndrome de abstinencia a GABA (SAG)

La interrupción abrupta de la instilación intracortical de GABA indujo actividad epileptiforme. La máxima actividad cortical se presentó en el área anatómica donde se instiló el GABA (CxS instilada derecha, Fig. 7.B). El tiempo de latencia en la aparición del primer complejo espiga-onda fue de  $15 \pm 5$  minutos después de la interrupción de la administración del aminoácido, estos complejos

se caracterizaron por ser espontáneos, de alta frecuencia (5-15 Hz) y gran amplitud ( $695 \pm 17 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ), con propagación en la corteza somatomotora contralateral izquierda (Fig. 7.B y Fig. 8.A y B).

### **Análisis del incremento de la frecuencia y la amplitud en el EEG del SAG**

El análisis espectral de frecuencia de Wavelets identificó un incremento del 114% el día de inducción con respecto a la línea base. Este día fue el de mayor potencia para ambas CxS (Fig. 7.B). Este cambio en la frecuencia del EEG se expresó gráficamente con un color rojo-amarillo (Fig. 7.A y B).

La CxS instilada (derecha) el día de inducción (día 0) mostró un aumento del 231% en la amplitud (previamente descrito,  $695 \pm 17 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ) comparado contra su registro control. En la evolución temporal del SAG, la amplitud del EEG disminuyó significativamente, el promedio del día 1 al día 5 de la abstinencia fue de  $490 \pm 13 \mu\text{V}^2/\text{Hz}/\text{día}$  ( $p < 0.01$  el cual corresponde a un 29% menor comparado con el día 0, Fig. 8.A). Esto representó un 157% de aumento en la amplitud durante el mantenimiento del SAG comparado contra el registro control (día 1-5; Fig. 8.A). Es decir, que la hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia fue mayor el día de la inducción (día 0), pero se redujo 24 h a partir de la interrupción de GABA.

El registro EEG de la CxS contralateral evidencio también un incremento en la amplitud del EEG el día de inducción del SAG (día 0), la señal electrofisiológica tuvo un promedio en la amplitud de  $446 \pm 9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , representando un incremento del 178% comparado con su línea base; la ganancia en la amplitud disminuyó un 14% a partir del día 1 y se mantuvo de esa manera hasta el día 5, el cual mostró un promedio de  $383 \pm 7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}/\text{día}$  ( $p < 0.01$ ; Fig. 8.A). Es decir, durante el mantenimiento del SAG, se manifestó un aumento del 122% de la amplitud del EEG sobre las condiciones basales, lo cual indica que el proceso epiléptico tiene una importante propagación.

## **Cuantificación de la actividad epileptiforme del SAG a través de los complejos espiga-onda**

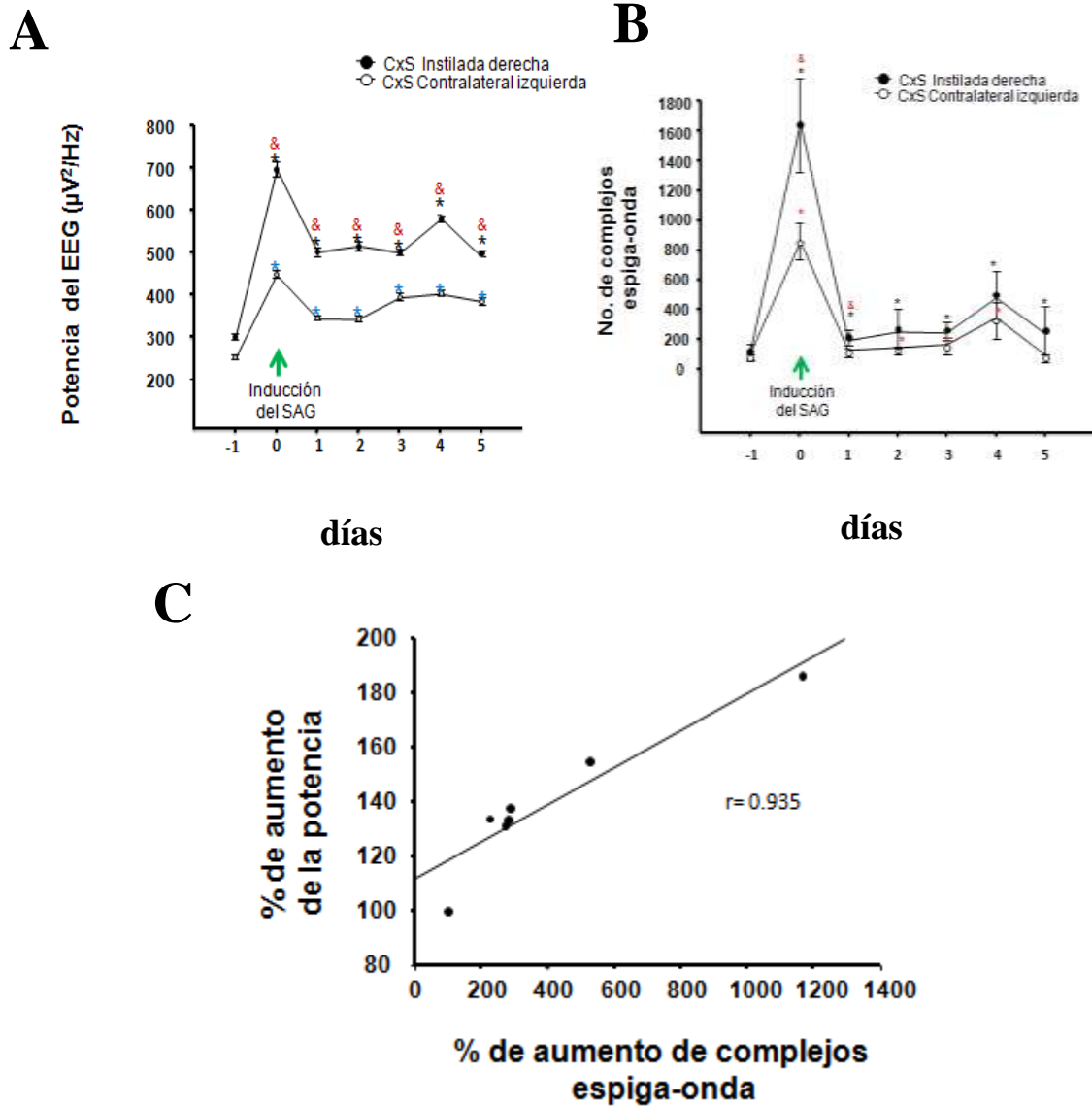
El seguimiento del EEG durante 5 días después de la interrupción de la administración del aminoácido hizo posible identificar que el día de la inducción del SAG (día 0) se presentó la máxima excitabilidad identificado por un periodo de 30 min; se cuantificaron  $1615 \pm 302$  complejos espiga-onda (0.9/seg), cifra que representó un aumento de 1794% comparado contra el registro EEG control. Durante el mantenimiento del SAG, la actividad epileptiforme disminuyó, de tal forma que del día 1 al día 5 se promediaron  $325 \pm 87$  complejos/día análisis de un periodo de 30 min. (0.1/seg; Fig. 8.B.  $p < 0.01$ ).

En la CxS contralateral a la instilación (izquierda), se identificó también un incremento en la actividad eléctrica cortical con respecto al registro EEG control. Se identificaron descargas epileptiformes de gran amplitud y alta frecuencia, sin embargo, en el seguimiento del SAG, se observaron algunas diferencias: el día de inducción del SAG (día 0) se identificó, que el número de complejos espiga-onda en un periodo de 30 min fue de  $828 \pm 115$  (0.5/seg), esto demostró un incremento del 1009% respecto a su línea base. Al día 1 del SAG la frecuencia de las descargas epileptiformes en este estado de abstinencia disminuyó, de esta forma se promedio  $197 \pm 63$  complejos/30 min/día (0.1/seg); este análisis identificó que la manifestación del SAG del día 1 al día 5 se mantiene, lo cual representa el 209% de incremento de complejos espiga-onda con respecto al EEG basal (Fig. 8.B.  $p < 0.01$ ).

## **Correlación del incremento de la frecuencia y de los complejos espiga-onda durante el SAG**

Esta tesis muestra por primera vez la relación proporcional entre porcentaje de amplitud y frecuencia de las descargas paroxísticas del EEG del SAG: entre mayor porcentaje de aparición de los complejos espiga-onda existe un mayor aumento en la potencia del registro (Fig. 8.C). Los resultados de este análisis, indicaron una correlación positiva ( $r=0.935$ ) entre ambas variables. Lo anterior indica que la hiperexcitabilidad neuronal de abstinencia al GABA tiene un correlato estrecho, entre la amplitud y la descarga epileptiforme.

## Análisis cuantitativo de la actividad electroencefalográfica del SAG



**Figura 8. Efectos de la abstinencia a GABA en la excitabilidad cortical (SAG).** (A) Se muestra el cambio en la amplitud del EEG en la evolución del SAG. CxS instilada derecha (círculos negros) y CxS contralateral (izquierda; círculos blancos). Nótese las diferencias significativas a partir del día de inducción, comparado contra el registro EEG control (día -1; N=5; \* $p<0.01$ ). (B) La abstinencia a GABA indujo la aparición de complejos espiga-onda, el máximo incremento de estos complejos fue el día de la inducción (día 0), durante la evolución del SAG (día 1-5) el número de complejos espiga-onda disminuyó, la hiperexcitabilidad neuronal tuvo propagación en la corteza somatomotora contralateral (N=5.\* $P<0.01$ ). Las diferencias entre cada una de las cortezas se muestran con & teniendo una significancia de  $P<0.01$ . (C) Correlación positiva con valores normalizados del porcentaje de incremento de complejos espiga-onda e incremento de la amplitud respecto a cada uno de los días de registro del SAG (N=5).



## **9.2 Modificaciones de la excitabilidad cortical inducido por la abstinencia a Dz (SAD)**

Con el objetivo de comparar el SAG con las características electrofisiológicas de una abstinencia inducida por otro agonista del receptor GABAA. El siguiente grupo experimental estuvo encaminado a generar una hiperexcitabilidad neuronal por la interrupción abrupta de la exposición crónica de la administración de Dz.

### **Condiciones EEG Basales**

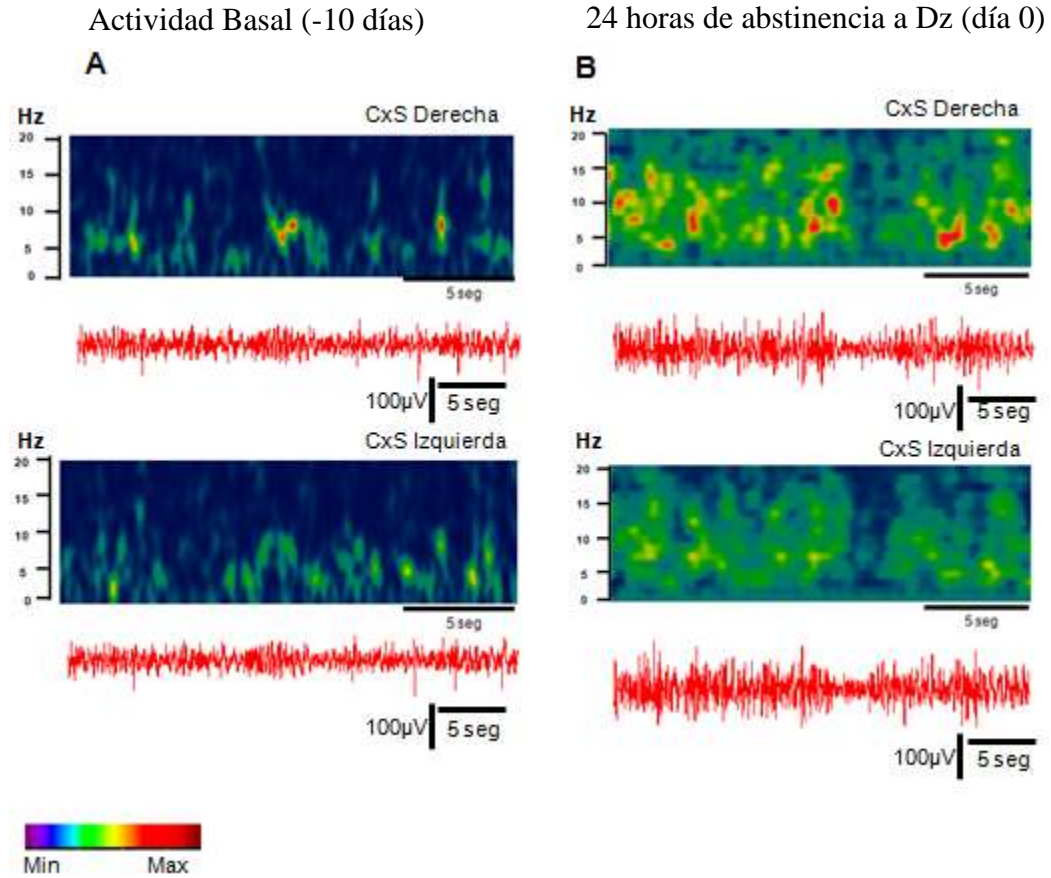
Los resultados del registro EEG control obtenidos durante 30 min, identificó un patrón de ondas rápidas de baja amplitud. El análisis cuantitativo de estas ondas (Wavelets) evidenció que la actividad cortical basal se encuentra en una banda de 7 Hz con amplitud promedio de  $164 \pm 2 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en ambas CxS; la manifestación espectral cromática de esta actividad basal fue representada en colores azules-verdes (Fig. 9.A). El análisis electrofisiológico indicó que en este registro control no tiene actividad espiga-onda, cambios repentinos de amplitud o de frecuencia (día -1; Fig. 9.A y Fig.10).

### **Inducción del síndrome de abstinencia a Dz (SAD)**

La interrupción abrupta del tratamiento crónico a esta benzodiacepina (Dz; 10 días, 7 mg/Kg; i.p) indujo manifestaciones en el EEG caracterizada por hiperexcitabilidad neuronal en ambas cortezas (Fig. 9.B). La latencia con la que aparecen los primeros complejos espiga-onda fue de 24 h, esta actividad fue espontánea, con un incremento significativo en la frecuencia (5-15 Hz) asociado a una ganancia importante en la amplitud ( $348 \pm 1 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ; Fig. 9. B. y Fig. 10).

La aplicación de Dz induce una actividad EEG lenta (5 Hz), sincrónica con una amplitud promedio de  $340 \pm 20 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en ambas CxS, lo cual es característico de los fármacos que regulan positivamente a la neurotransmisión GABAérgica.

## Espectros de frecuencia y registros EEG durante el SAD



**Figura 9. Síndrome de abstinencia a Dz (SAD) en rata.** A-B Espectros de frecuencia y registros electroencefalográficos representativos de un animal con actividad cortical en condiciones basales (panel de la izquierda) y con manifestaciones de hiperexcitabilidad neuronal como resultado de la interrupción abrupta de la administración de Dz (Dz; vía i.p; panel de la derecha). (A) Espectro de frecuencia que muestra la actividad basal cortical en color azul, que corresponde al registro EEG control de la CxS derecha (registro inferior). Continuando, abajo de esta secuencia se muestra la actividad de la CxS izquierda. (B) Aumento en la potencia asociado a la aparición de complejos espiga-onda que se muestran en bandas de color rojo, entre 5-15 Hz (Max, barra inferior izquierda). Nótese que el aumento de la actividad cortical es simétrico en ambas cortezas cerebrales (N=5).

## **Análisis del incremento de la frecuencia y de la amplitud en el EEG durante el SAD**

El análisis espectral de Wavelets identificó un incremento significativo en la banda de frecuencia del EEG de 15 Hz; 24 horas después de la interrupción de la administración de Dz, esto representó un aumento del 114 % de la potencia del EEG comparado respecto a la línea base. El día de inducción, fue el de mayor hiperexcitabilidad para ambas CxS (Fig. 9.B). Este incremento en la frecuencia del EEG se expresó gráficamente con un color rojo-amarillo (Fig. 9.A y B).

En la inducción del SAD, la CxS derecha mostró una amplitud promedio de  $349 \pm 6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , este valor representó un aumento de un 212% comparado contra su registro EEG control. En la evolución temporal del SAD, la amplitud disminuyó significativamente, el promedio del día 1 al día 4 de la abstinencia fue de  $225 \pm 9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}/\text{día}$  ( $p < 0.01$  el cual corresponde un 35% menor comparado contra el día de inducción, Fig. 10.A). Por lo tanto, durante el mantenimiento del SAD se cuantificó un 137% de aumento en la amplitud comparado con el registro basal.

Datos similares se observaron en el registro EEG de la CxS izquierda el día de inducción, la amplitud promedio del EEG fue de  $346 \pm 5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , esto representó un incremento del 210% comparado con la línea base. La ganancia en la amplitud disminuyó un 24%, a partir del día 1 al día 4, se cuantificó una amplitud promedio de  $261 \pm 6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}/\text{día}$  ( $p < 0.01$  Fig. 10.B). Es decir, que durante la evolución del SAD, la corteza izquierda mantuvo un aumento del 159% de la amplitud del EEG sobre las condiciones EEG basal.

## **Cuantificación de la actividad epileptiforme del SAD a través de complejos espiga-onda**

El seguimiento de la actividad electrofisiológica durante 5 días después de la interrupción de la administración del Dz permitió identificar al día de inducción

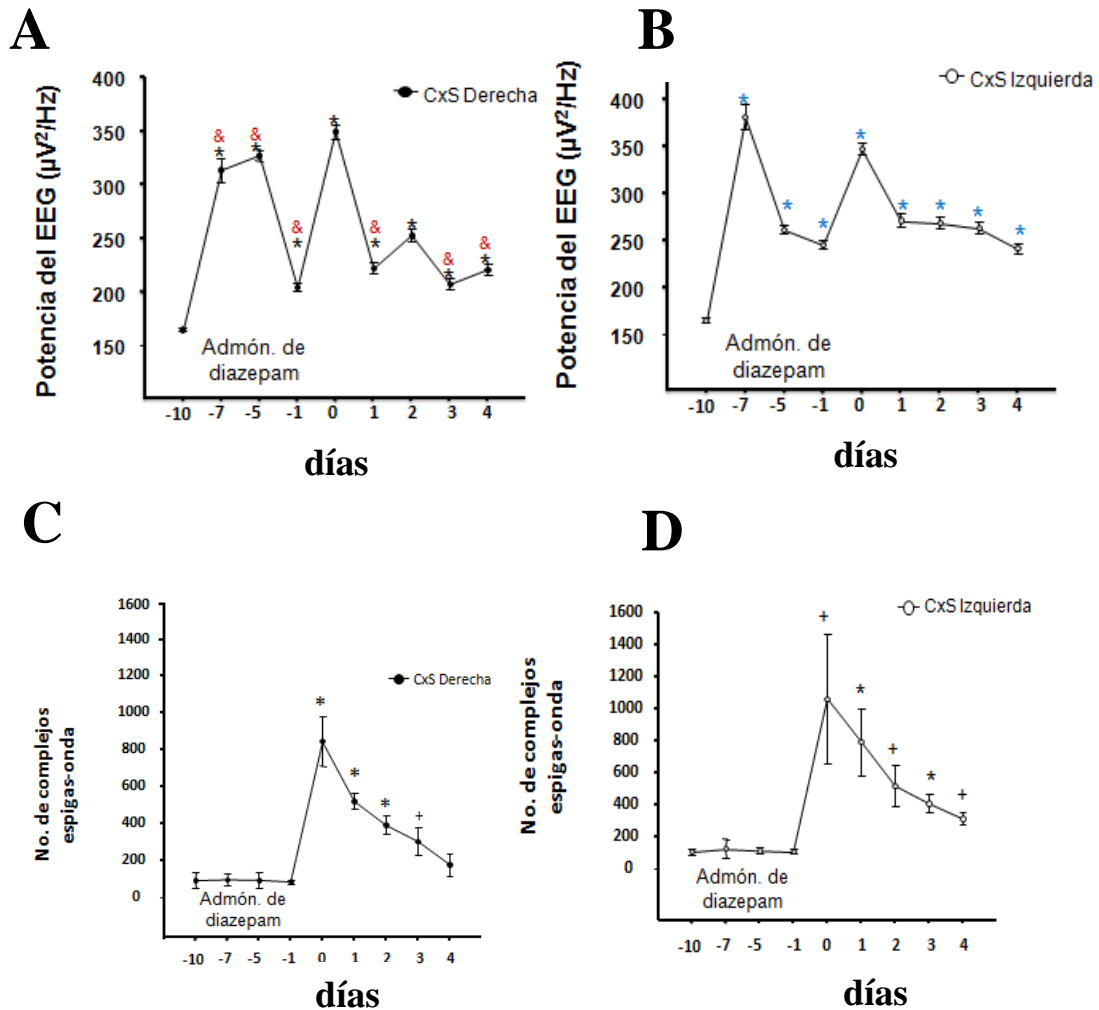
del SAD con el máximo incremento de la excitabilidad en ambas cortezas. El día de inducción de la abstinencia, en la CxS derecha se cuantificaron  $846 \pm 134$  complejos espiga-onda (30 minutos; 0.4/seg), cifra que representó un aumento del 613% comparado contra su registro EEG control. Durante el mantenimiento del SAD, la frecuencia de las descargas paroxísticas se fue reduciendo gradualmente, de tal forma que del día 1 al día 4 se promediaron  $240 \pm 44$  complejos/30 min /día (0.1/seg; Fig.10.C.  $p < 0.01$ ). En resumen, el mantenimiento del SAD tiene como característica el incremento de la excitabilidad neuronal del 263%; medido a través del número de complejos espiga-onda.

La CxS izquierda, también incremento su actividad cortical con respecto al registro EEG control. Fue evidente la aparición de descargas epileptiformes: el día de inducción del SAD el número de complejos espiga-onda fue de  $1062 \pm 404/30$  min (0.5/seg), esto representó un incremento del 769% respecto a su línea base. La presencia de las descargas epileptiformes también fue transitorio en la CxS izquierda, del día 1 al día 4 se promedio  $362 \pm 33$  complejos/30 min/día (0.2/seg), lo cual representó un incremento de 194% (Fig. 10.D;  $p < 0.01$ ).

### **Correlación lineal del incremento de la frecuencia y de los complejos espiga-onda durante el SAD**

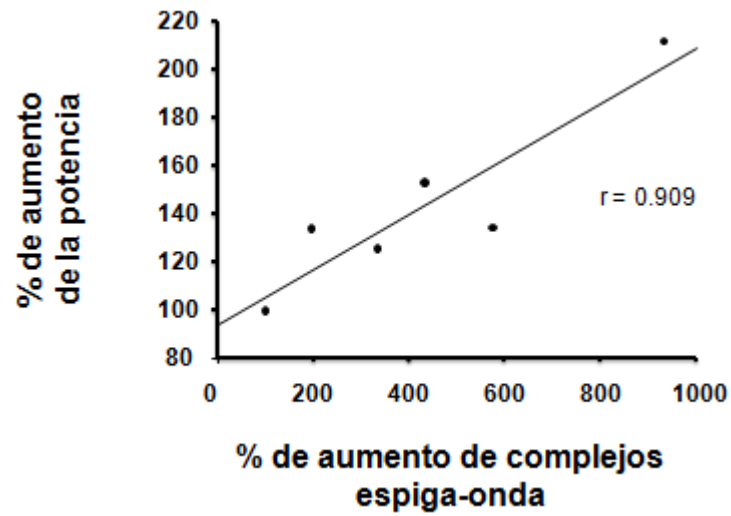
El análisis de correlación lineal que se realizó entre el porcentaje del aumento en la amplitud y el porcentaje de incremento de complejos espiga-onda, indicaron una correlación positiva entre ambas variables ( $r = 0.909$ ): esto indica que, a mayor porcentaje de la amplitud del EEG, se asocia a un mayor porcentaje de complejos espiga-onda (Fig.11). De esta manera, la hiperexcitabilidad neuronal inducida por la abstinencia a Dz es semejante a lo que se cuantificó con el SAG.

## Análisis cuantitativo de la actividad electroencefalográfica del SAD



**Figura 10. Efectos EEG del síndrome de abstinencia al Dz (SAD).** (A) La CxS derecha muestra un aumento en la amplitud inducido por la administración de Dz (día -7 y -5) seguido de una pérdida de la actividad farmacológica de la Bz (día -1; tolerancia), el día de inducción de la abstinencia a Dz se manifestó un incremento en la amplitud, sin embargo, durante la evolución (día 1 y 4) es evidente una disminución en el voltaje del EEG (N=5. \*P<0.01). (B) En la CxS izquierda el cambio en la amplitud del EEG es similar al de la CxS derecha (N=5. \*P<0.01). (C) El SAD indujo la aparición de complejos espiga-onda en la CxS derecha, mostrando el máximo incremento de estos complejos a partir del día de inducción, sin embargo, durante su evolución los complejos espiga-onda se reducen gradualmente (N=5. \*P<0.01; +P<0.05). (D) La CxS izquierda muestra la aparición de los complejos espiga-onda, su presencia transitoria fue similar a la presentada en la CxS derecha (N=5. \*P<0.01; +P<0.05). Las diferencias entre cada una de las cortezas se muestran & con una significancia de P<0.05.

### Correlación EEG del SAD



**Fig. 11. Correlación lineal del SAD.** Correlación positiva correspondientes a cada uno de los días registrados durante la evolución del SAD, el porcentaje de incremento de complejos espiga-onda y el porcentaje de aumento de la amplitud tienen una relación estrecha (5 días; N=5).

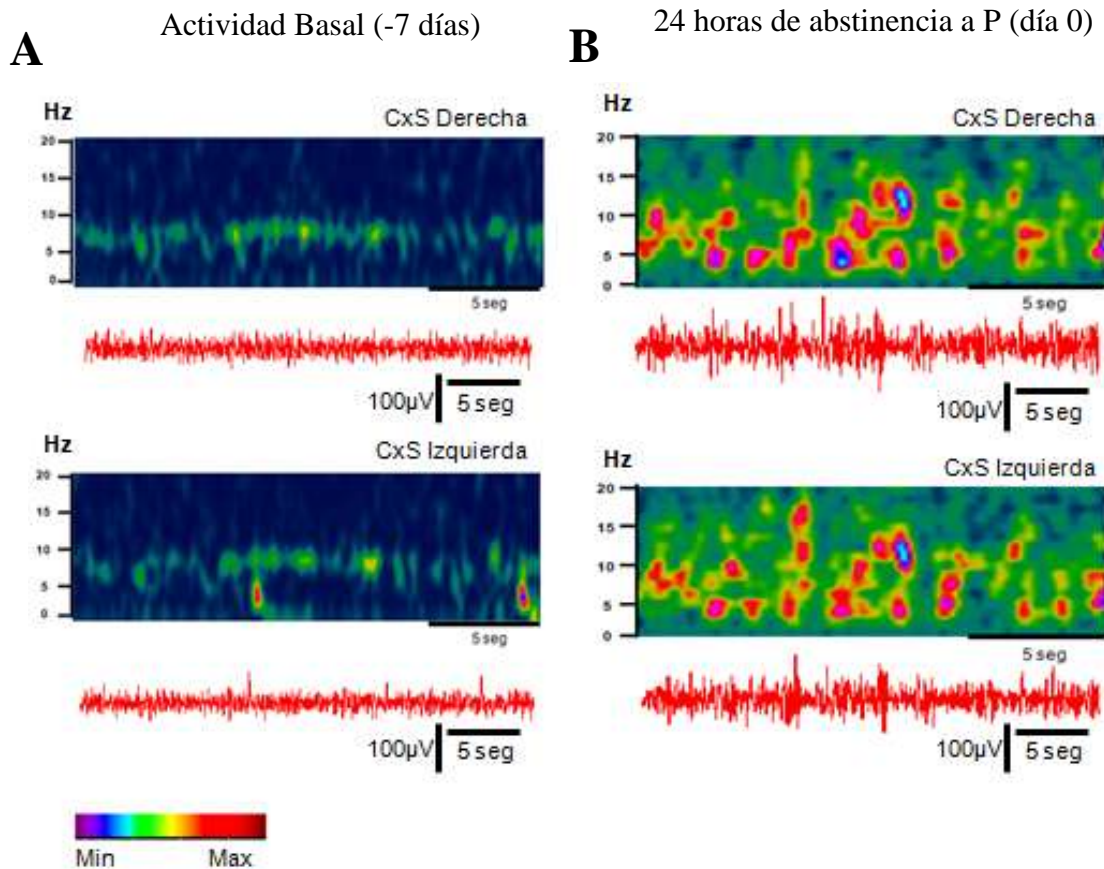
### **9.3 Caracterización electroencefalográfica de la abstinencia a P de exposición crónica (SAProg crónico)**

Los resultados previos de esta tesis muestran que la instilación intracortical de GABA y la administración crónica de una benzodiacepina, inducen hiperexcitabilidad en la corteza cerebral después de interrumpir su exposición, ambos eventos tienen características semejantes en la inducción y el comportamiento electrofisiológico. Debido a que la P es un modulador alostérico positivo del receptor GABAA, no conocemos su potencial farmacológico para inducir abstinencia, por eso, la siguiente serie de experimentos estuvo enfocada a identificar en el EEG el efecto electro-farmacológico de la exposición crónica y la consecuente inducción de la abstinencia a P (P; 7 días, 45mg/Kg; s.c).

#### **Condiciones EEG Basales**

En el registro EEG control, en un periodo de 30 min, se mostró un patrón de ondas rápidas de baja amplitud semejante a lo identificado previamente en otros grupos. El análisis cuantitativo de Wavelets permitió cuantificar que la banda de frecuencia basal corresponde a un espectro de 5-7 Hz y un promedio en la amplitud de  $146 \pm 3 \mu V^2/Hz$  en ambas CxS; la manifestación espectral cromática de esta actividad cortical basal también fue representada en colores azules-verdes en la gráfica del espectro de Wavelets (Fig. 12.A).

## Espectros de frecuencia y registros EEG durante el SAProg crónico



**Figura 12. Síndrome de abstinencia a P crónico (SAProg crónico) en rata.** A-B Espectros de frecuencia y registros electroencefalográficos representativos de un animal con actividad cortical en condiciones basales (panel de la izquierda) y con manifestaciones de hiperexcitabilidad neuronal como resultado de la interrupción abrupta de la administración de crónica de P vía s.c (panel de la derecha). (A) Espectro de frecuencia con actividad basal cortical con predominio del color azul, que corresponde al registro EEG control de la CxS derecha (registro inferior). Debajo de esta secuencia se muestra la actividad de la CxS izquierda en orden semejante. (B) Espectro de frecuencia que refleja un aumento en la potencia que se manifiesta con la aparición de bandas de color rojo entre 5-15 Hz (Max, barra inferior izquierda), se identificó la aparición de complejos espiga-onda. Nótese que el aumento de la actividad cortical es semejante en ambas cortezas.



## **Inducción del síndrome de abstinencia a P crónico (SAProg crónico)**

La interrupción súbita de la administración crónica de P indujo manifestaciones en el EEG semejantes a las generadas por la abstinencia al Dz. La hiperexcitabilidad neuronal en ambas CxS es similar también a las inducidas por la abstinencia al Dz y al GABA (Fig. 12.B). Posterior a la última administración de P, los animales mostraron un tiempo de latencia de 24 horas en la aparición de las descargas paroxísticas, esta actividad se caracterizó por ser espontánea, de alta frecuencia (20 Hz) y gran amplitud ( $303 \pm 27 \mu V^2/Hz$ ), el número de las descargas paroxísticas y la amplitud del registro EEG, fueron similares en ambas CxS (Fig. 12.B. y Fig. 13.A y B).

### **Análisis del incremento de la frecuencia y de la amplitud en el EEG durante el SAProg crónico**

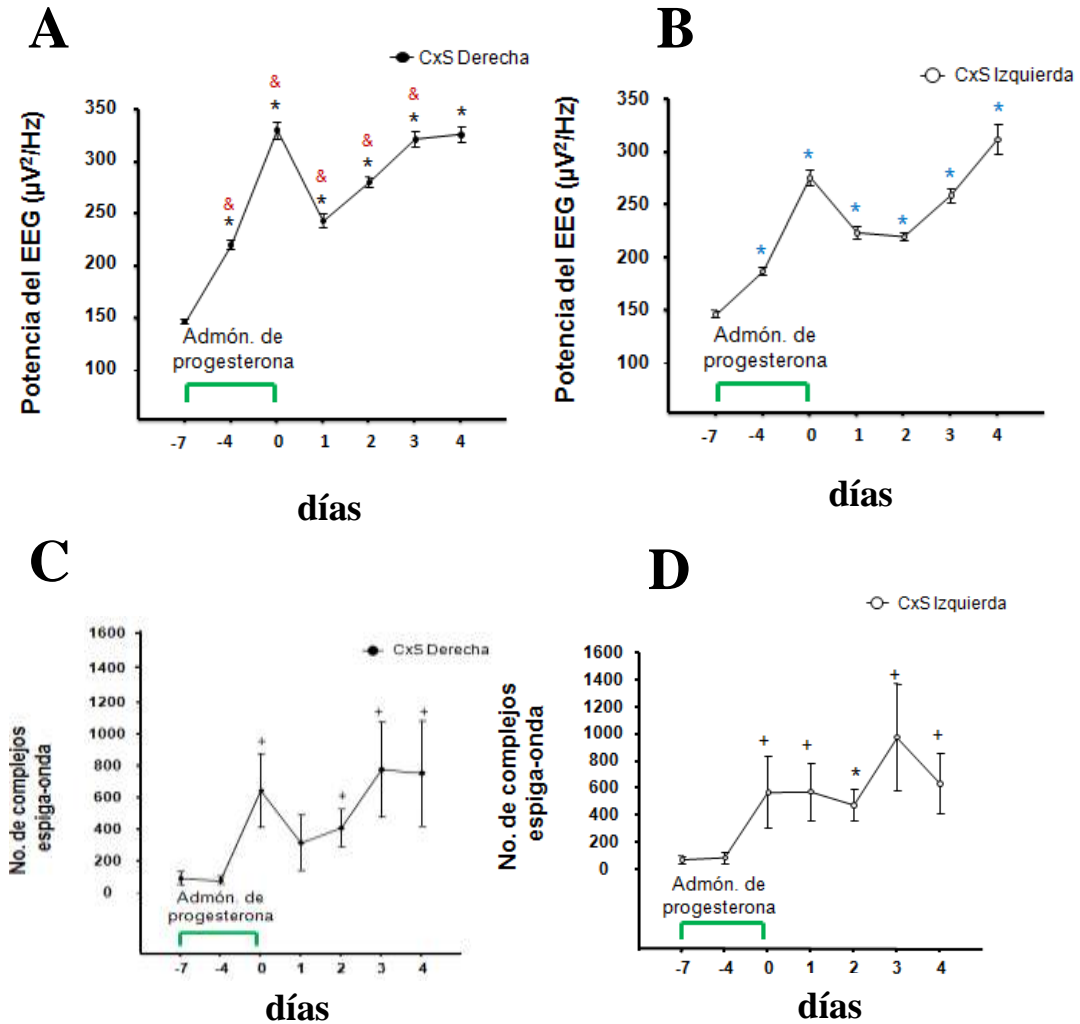
El análisis espectral de frecuencia de Wavelets identificó que la abstinencia tiene un incremento significativo en la banda de frecuencia de 4-20 Hz del EEG en el día de inducción, lo cual representó un aumento del 185% con respecto al registro control. Este incremento en la frecuencia del EEG se expresó gráficamente con un color rojo-amarillo (Fig.12.A y B).

El día de inducción del SAProg, la CxS derecha mostró una amplitud del EEG de  $330 \pm 8 \mu V^2/Hz$ , esta cifra representó un aumento de un 226% comparado contra su registro EEG control. En la evolución del SAProg crónico, la amplitud disminuyó discretamente, el promedio del día 1 al día 4 de la abstinencia fue de  $324 \pm 1 \mu V^2/Hz/día$ ;  $p < 0.01$  (el cual corresponde a 1.8% menor comparado contra el día de inducción, Fig.13. A). El SAProg crónico contrasta con los otros modelos de abstinencia en lo referente a la amplitud del EEG la cual no decae a partir del día de inducción, ya que ésta se mantiene sin cambios en la fase de

mantenimiento. El aumento en la amplitud durante el mantenimiento del SAProg crónico es de un 221% comparado contra el registro EEG control.

Datos similares en los cambios de frecuencia y potencia se obtuvieron en el registro EEG de la CxS izquierda, el incremento en la amplitud del EEG el día de inducción, fue de  $275 \pm 7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , representando un incremento del 188% comparado con su registro EEG control. La ganancia en la amplitud aumentó discretamente un 4%, a partir del día 1 al día 4 mostró un promedio de  $285 \pm 18 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ;  $p < 0.01$  (Fig. 13.B). Es decir, que durante el mantenimiento del SAProg crónico, se manifestó un aumento del 195% de la amplitud del EEG sobre las condiciones basales.

## Análisis cuantitativo de la actividad electroencefalográfica del SAProg crónico



**Figura 13. Efectos de la abstinencia a P de administración crónica en la excitabilidad cortical (SAProg crónico).** (A) La CxS derecha muestra un aumento en la amplitud (día -4), durante el día de inducción a la abstinencia a P (día 0) se identifica un incremento en la amplitud de la señal eléctrica, sin embargo durante la evolución de la abstinencia (días 1-4) se cuantificó un discreto aumento en el voltaje del EEG (N=5; \*P<0.01). (B) En la CxS izquierda el cambio en la amplitud del EEG es similar al de la CxS derecha (N=5; \*P<0.01). (C) La abstinencia a P indujo la aparición de complejos espiga-onda en la CxS derecha, mostrando las primeras descargas epileptiformes a partir del día de inducción, durante la evolución del SAProg crónico los complejos espiga-onda se incrementaron gradualmente (N=5; \*P<0.01). (D) En la CxS izquierda la aparición de los complejos espiga-onda y su aumento paulatino fue similar a la presentada en la CxS derecha (N=5; \*P<0.01). Las diferencias entre cada una de las cortezas se muestran & con una significancia de P<0.05.

## **Cuantificación de la actividad epileptiforme en el SAProg crónico a través de complejos espiga-onda**

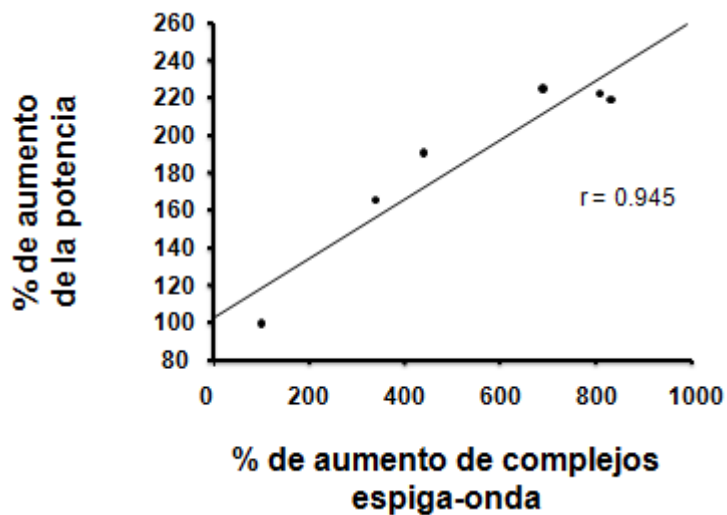
El registro de la actividad electrofisiológica de la corteza somatomotora derecha durante 7 días a partir de la última dosis de P, nos permitió identificar que la abstinencia al NE también se manifiesta por modificaciones al EEG las cuales son clasificables en latencia y mantenimiento del síndrome. 24h después de la interrupción de la administración de P, aparecen complejos espiga-onda, latencia semejante a la que generan distintas drogas GABAérgicas. La latencia del SAProg se caracterizó por la presencia significativa de complejos espiga-onda los cuales tuvieron un promedio de  $646 \pm 229$  eventos en 30 min (0.3/seg). Este valor representó un aumento del 687% comparado contra el registro control. Durante el mantenimiento del SAProg crónico, el promedio del número de complejos espiga-onda en los días 1 y 2 fue de  $365 \pm 47/30$  min (0.2/seg). Es de llamar la atención que los días 3 y 4 fue posible identificar la máxima excitabilidad cortical, el promedio de eventos espiga-onda fue de  $767 \pm 11/30$  min día (0.4/seg; Fig.13. C). Es decir, que la abstinencia crónica a P es mayor en su evolución de la actividad electrofisiológica y no en los primeros días de haberse iniciado.

En la CxS izquierda, el registro EEG también mostró un aumento en la actividad cerebral comparado con su registro electrofisiológico control. Es evidente la aparición de complejos espiga-onda de alta frecuencia y amplitud. Durante el seguimiento del SAProg crónico en la CxS izquierda se observaron algunas semejanzas con respecto al hemisferio derecho: el promedio de complejos espiga-onda el día de inducción fue de  $572 \pm 264/30$  min (0.3/seg), esto significa un incremento del 794% respecto a su línea base. El promedio de complejos espiga-onda en los días 1 y 2 fue de  $527 \pm 49/30$  min/día (0.3/seg) y en los días 3 y 4 se promediaron  $807 \pm 170/30$  min/día (0.4/seg) complejos (Fig.13.D).

## Correlación del incremento de la frecuencia y de los complejos espiga-onda durante el SAProg crónico

El análisis de la correlación lineal que se realizó entre el porcentaje de aumento de la amplitud de la señal electrofisiológica y el porcentaje de incremento de complejos espiga-onda, permiten identificar una correlación positiva ( $r= 0.945$ ) entre ambas variables: de esta manera se indica que, a mayor porcentaje de la amplitud del EEG se correlaciona con un incremento en el número de complejos espiga-onda de la señal eléctrica del cerebro (Fig.14), es decir, semejante a lo que ha sucedido con otros síndromes de abstinencia, el SAProg crónico tiene una relación proporcional entre el aumento del voltaje con la aparición y la frecuencia de complejos epileptiformes.

### Correlación EEG del SAProg crónico



**Fig. 14. Correlación EEG del síndrome de abstinencia a P crónico (SAProg crónico).** Durante la evolución del SAProg crónico el porcentaje de incremento de complejos espiga-onda y el porcentaje de aumento de la amplitud muestran una correlación positiva correspondientes a cada uno de los días registrados (5 días; N=5).

#### **9.4 Caracterización electroencefalográfica de la abstinencia a P intracortical (SAProg)**

En esta tesis identificamos que la abstinencia al Dz, al GABA y a la P por administración crónica incrementa la excitabilidad neuronal. La última serie de experimentos estuvo orientada a identificar por primera vez a través del registro EEG si la interrupción súbita de la administración aguda de una concentración alta de P (5 mM/6  $\mu$ L/2 h) intracortical es capaz de inducir también hiperexcitabilidad neuronal. Sugiriendo que esto sea el proceso heurístico de todas las abstinencias.

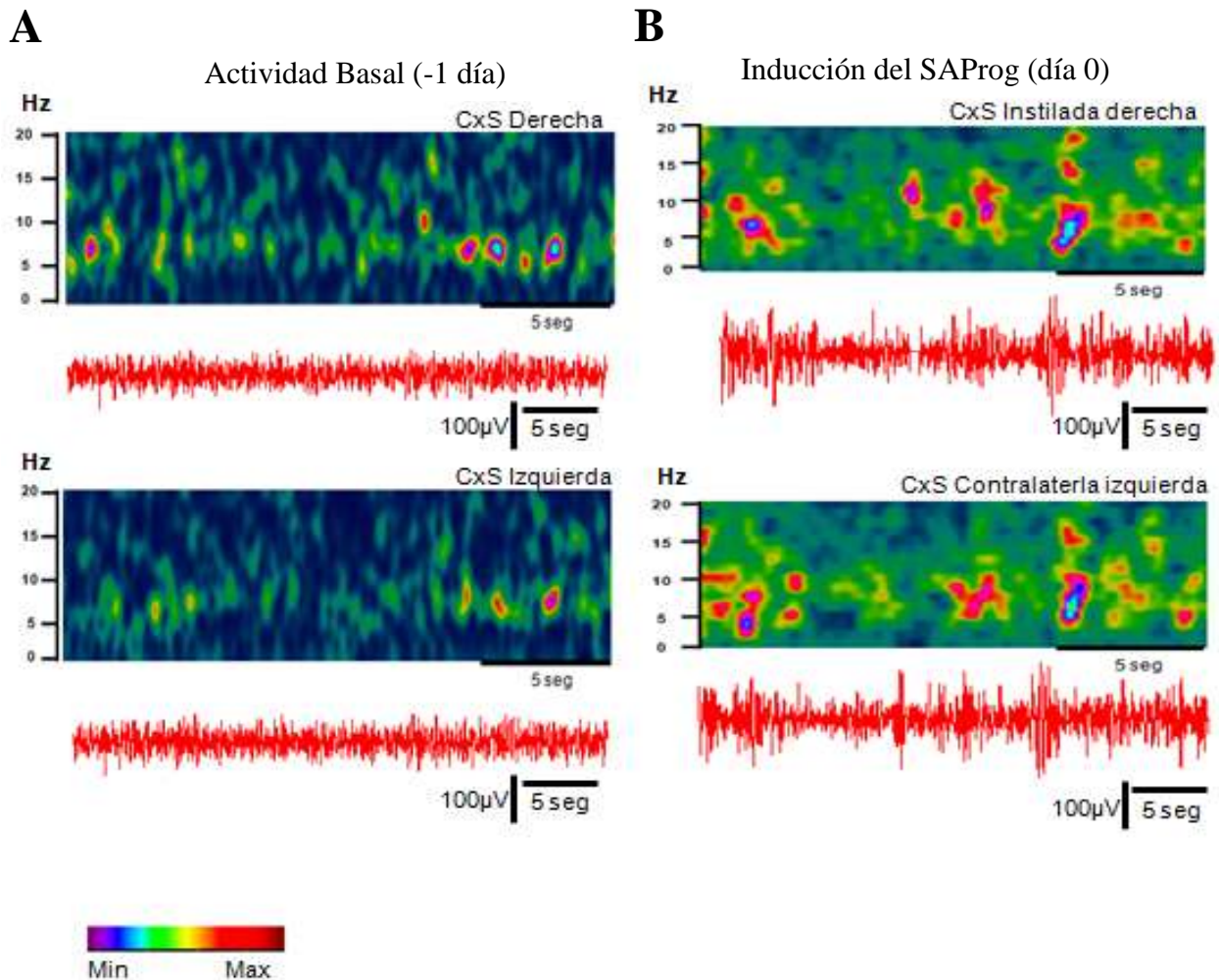
##### **Condiciones EEG Basales**

El registro EEG control, durante un periodo de 30 min identificó un patrón de frecuencia rápidas con baja amplitud, lo cual coincide con la actividad basal semejante a todos los grupos control que se han trabajado en esta tesis. El análisis cuantitativo de Wavelets identificó que la banda de frecuencia basal correspondió a un espectro de 5-7 Hz y una potencia promedio de  $307 \pm 14 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , la manifestación del espectro en color de esta actividad cortical fue representada en azules-verdes en la gráfica del espectro de potencia (Fig.15.A y Fig.16).

##### **Inducción del síndrome de abstinencia a P intracortical (SAProg agudo)**

La interrupción súbita de la instilación intracortical de P en la CxS derecha indujo actividad epileptiforme identificada en el EEG. La máxima actividad cortical se presentó en el área donde se instiló la P, similar al fenómeno que desarrollo el GABA (CxS instilada derecha, Fig.15.B). El tiempo de latencia de aparición del primer complejo espiga-onda fue de  $15 \pm 5$  minutos después de interrumpir la instilación del esteroide, estos complejos se caracterizaron por tener alta frecuencia (20 Hz) y gran amplitud ( $1477 \pm 17 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ) de la señal EEG, ambos eventos asociados con una significativa propagación en la corteza somatomotora contralateral izquierda (Fig.15.B y Fig.16.A y B).

## Espectros de frecuencia y registros EEG durante el SAProg intracortical



**Figura 15. Síndrome de abstinencia a P intracortical (SAProg agudo) en rata.** A-B Espectros de frecuencia y registros electroencefalográficos representativos de un animal con actividad cortical en condiciones basales (panel de la izquierda) y con manifestaciones de hiperexcitabilidad neuronal como resultado de la interrupción de la instilación intracortical de P (panel de la derecha). (A) Espectro de frecuencia de actividad cortical basal con predominio del color azul, que corresponde al registro EEG control de la corteza CxS derecha (registro inferior). Debajo de esta secuencia se muestra la actividad de la CxS izquierda en orden semejante. (B) Espectro de frecuencia que refleja un aumento en la potencia que se manifiesta con la aparición de bandas de color rojo entre 5-15Hz (Max, barra inferior izquierda), se identificó la aparición de los complejos espiga-onda. Nótese que la máxima actividad cortical se encuentra en la CxS instilada derecha.

## **Análisis del incremento de la frecuencia y la amplitud en el EEG del SAProg intracortical**

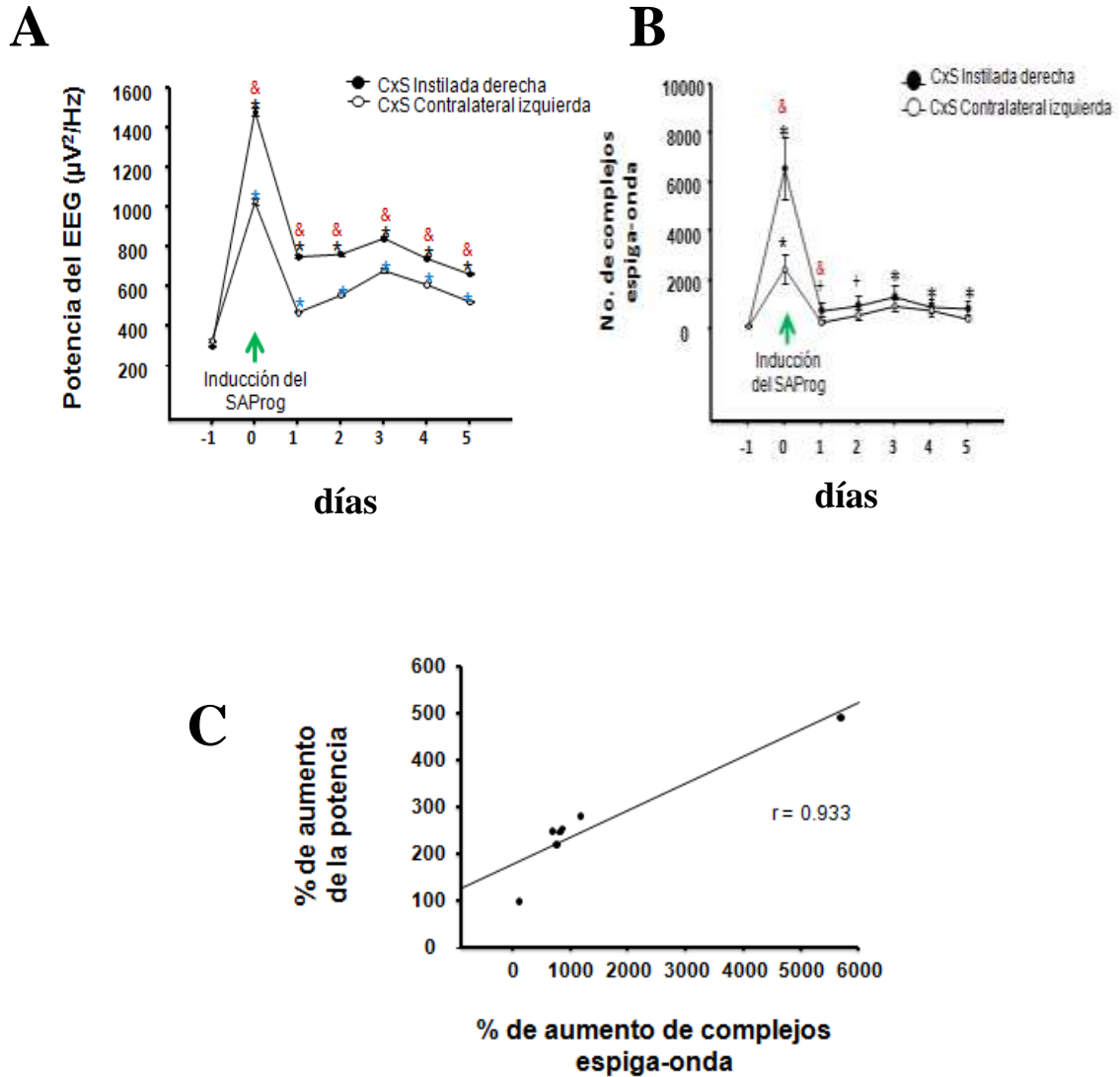
El análisis espectral de la señal de este grupo de trabajo identificó un incremento del 185% en la potencia de la señal electrofisiológica el día de inducción de la abstinencia con respecto al registro control. La inducción del SAProg intracortical está marcada por un importante incremento en la excitabilidad neuronal para ambas CxS (Fig.15.B). Este cambio en la frecuencia se expresó gráficamente con un color rojo-amarillo en el análisis de la potencia del EEG (Fig. 15.A y B).

El día de inducción de la abstinencia aguda a P (día 0) la CxS instilada (derecha) mostró un aumento del 492% (previamente descrito en la página 64 de esta tesis) en la amplitud comparado contra su registro control. En la evolución electrofisiológica del SAProg intracortical, la amplitud del EEG disminuyó significativamente, el promedió del día 1 al día 5 de la abstinencia fue de  $750 \pm 28 \mu V^2/Hz/día$ ;  $p < 0.01$  (el cual corresponde a un 49% menor comparado con el día 0, Fig.16.A). Esto representó un 255% de aumento en la amplitud durante el mantenimiento del SAProg intracortical comparado contra el registro control (día 1-5; Fig.16.A). Es decir, que la abstinencia inducida por P intracortical fue mayor el día de la inducción (día 0), pero se redujo 24 h después de la interrupción de su instilación semejante a lo que induce el SAG.

El registro EEG de la CxS contralateral evidencio también un incremento en la amplitud el día de inducción de la abstinencia (día 0), la actividad eléctrica tuvo un promedio en la amplitud de  $1025 \pm 14 \mu V^2/Hz$ , representando un incremento del 318% comparado con su línea base; la ganancia en la amplitud disminuyó un 44% a partir del día 1 y se mantuvo así hasta el día 5, el cual mostró un promedio de  $565 \pm 36 \mu V^2/Hz/día$  ( $p < 0.01$ ; Fig.16.A). Es decir, durante el mantenimiento del SAProg intracortical, el aumento en la amplitud del EEG fue del 175% sobre las condiciones basales.



## Análisis cuantitativo de la actividad electroencefalográfica del SAProg agudo



**Figura 16. Abstinencia a P, efectos en la excitabilidad cortical en forma aguda (SAProg).** (A) Se muestra el cambio en la amplitud del EEG en la evolución del SAProg agudo. CxS instilada derecha (círculos negros) y CxS contralateral (izquierda; círculos blancos). Nótese las diferencias significativas a partir del día de inducción, comparado contra el registro EEG control (día -1; N=5; \* $p < 0.01$ ). (B) La abstinencia a P indujo la aparición de complejos espiga-onda, el máximo incremento de estos complejos fue el día de la inducción (día 0), durante la evolución del SAProg (día 1-5) el número de complejos espiga-onda disminuyó, la hiperexcitabilidad neuronal tuvo propagación en la corteza somatomotora contralateral (N=5; \* $P < 0.01$ ). Las diferencias entre cada una de las cortezas se muestran con & con una significancia de  $P < 0.01$ . (C) Correlación positiva con valores normalizados del porcentaje de incremento de complejos espiga-onda e incremento de la amplitud respecto a cada uno de los días de registro del SAProg agudo (N=7).

## **Cuantificación de la actividad epileptiforme del SAProg intracortical a través de los complejos espiga-onda**

El día de la inducción del SAProg intracortical (día 0) se presentó la máxima excitabilidad cortical identificado por la cuantificación de  $6558 \pm 1251$  complejos/30 min (3.6/seg), cifra que representó un aumento de 5682% comparado con su registro EEG control. En la fase de mantenimiento del SAProg intracortical, la frecuencia de la actividad epileptiforme disminuyó, de tal forma que del día 1 al día 5 se promediaron  $982 \pm 97$  complejos/día en un periodo de 30 min (0.5/seg) lo cual representó un incremento del 2218% sobre la línea base (Fig. 16.B;  $p < 0.01$ ).

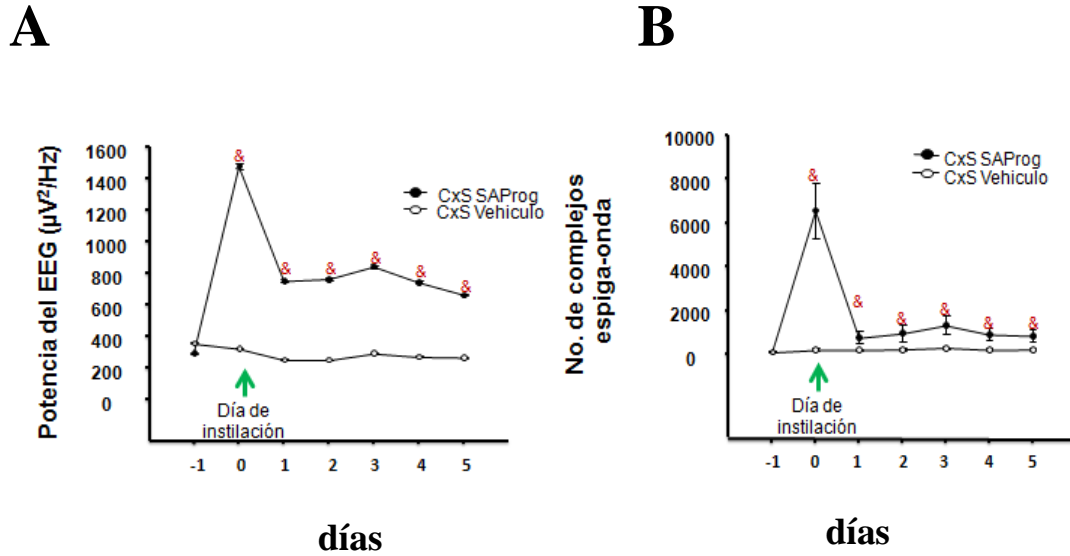
La CxS contralateral (izquierda), también mostró un incremento en la actividad cortical con respecto al registro EEG control. Se cuantificó la aparición de descargas epileptiformes de gran amplitud y alta frecuencia, sin embargo, en el seguimiento del SAProg intracortical, se observaron algunas diferencias con respecto a la corteza derecha: el día de inducción del SAProg (día 0) se identificó, que el número de complejos espiga-onda en un periodo de 30 min fue de  $2440 \pm 620$  (1.3/seg), es decir se manifestó un incremento del 2218% respecto a su línea base. A partir del día 1 del SAProg intracortical la frecuencia de las descargas epileptiformes disminuyó, se promedio  $605 \pm 166$  complejos/30 min (0.3/seg) en el día 1 lo cual se mantiene hasta el día 5, esto representa un 550% de incremento en el número de complejos epileptiformes (Fig. 16.B;  $p < 0.01$ ).

El vehículo en el cual se disolvió la P, no mostró efectos sobre la actividad cortical. En resumen, la interrupción abrupta de la instilación intracortical de la P es la responsable de inducir la hiperexcitabilidad neuronal (Fig.17).

### **Correlación del incremento de la frecuencia y de los complejos espigonda durante el SAProg intracortical**

Los resultados del análisis de correlación que se realizó entre el porcentaje de aumento de la amplitud y el porcentaje de aumento de los complejos espigonda, tienen una correlación positiva ( $r=0.933$ ) entre ambas variables (Fig.16.C). Esto significa que la hiperexcitabilidad neuronal tiene un correlato estrecho, entre mayor amplitud, mayor descarga epileptiforme, similar a lo observado durante la abstinencia a GABA, al Dz y a la P de administración crónica.

## La abstinencia a P induce aumento en la amplitud y aparición de complejos epileptiformes en la corteza cerebral



**Figura 17. Modificaciones electrofisiológicas inducidas por la abstinencia a P intracortical.** (A) El cambio en la amplitud del EEG es inducido por la abstinencia a P (círculos negros), el vehículo de P (aceite) es inerte y no genera cambios electrofisiológicos y no modifica la actividad basal del EEG. Es decir es la interrupción de la instilación de P es la que genera los datos electrofisiológicos de abstinencia. (B) La abstinencia a P indujo la aparición de complejos espiga-onda. La abstinencia del vehículo no ( $p < 0.01$ ). Asimismo, la administración de este vehículo en la misma velocidad y tiempo de instilación no genera cambios EEG. Esto descarta que los cambios identificados por la abstinencia a P sean consecuencia de irritación, lesión o modificación neuronal del microambiente de la corteza cerebral.

## **9.5 Comparaciones electrofisiológicas entre los diferentes síndromes de abstinencia**

En la presente tesis se realizó por primera vez un análisis cuantitativo para identificar las diferencias electrofisiológicas que existe entre los diferentes síndromes de abstinencia. A través del análisis del porcentaje del incremento de la amplitud de la señal eléctrica y el análisis de los complejos espiga-onda.

El día de inducción del SAG, el porcentaje de incremento en la amplitud de la señal electrofisiológica fue del 231%; en tanto que el aumento que presentó el SAD fue del 212%. En referencia al grupo del SAProg crónico se cuantificó un aumento del 226% y finalmente el SAProg agudo mostró un incremento significativo de la amplitud del 492% (Fig.18.A).

La característica del foco epileptogénico del SAG es la aparición de los complejos espiga-onda, la cual al compararse con el EEG control permitió cuantificar un 1167% de incremento del número de eventos epileptiformes; el SAD presentó un incremento del 929% de actividad epiléptica, mientras tanto, el SAProg crónico evidenció el 687% de aumento en las descargas paroxísticas y el SAProg agudo tuvo un 5682% de incremento de complejos espiga-onda (Fig.18.B).

Los datos anteriores indican que la interrupción de la instilación intracortical de P generó una mayor excitabilidad en la corteza cerebral comparada con los síndromes de abstinencia inducidos por el GABA, el Dz ó la P de administración crónica.

### Diferencias electrofisiológicas

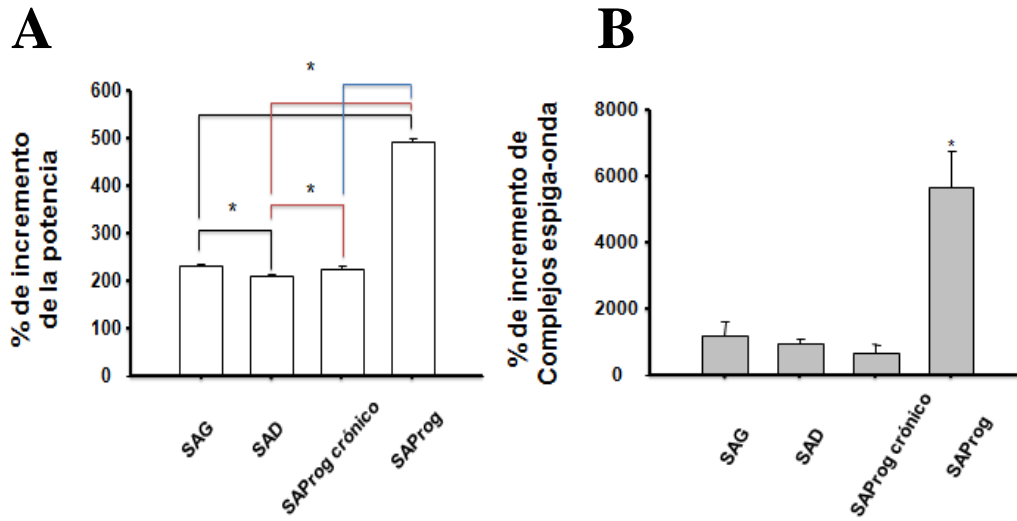


Figura. 18. Diferencias de las manifestaciones de hiperexcitabilidad en el EEG entre los diferentes síndromes de abstinencia en el día de inducción. (A) Porcentaje de incremento de la amplitud del EEG. (B) Incremento de los complejos espiga-onda en los diferentes síndromes de abstinencia (\* $p < 0.01$ ).

## 10. Discusión

Hemos identificamos el incremento en la excitabilidad neuronal en el EEG de la corteza cerebral somatomotora a través de un análisis de potencia y frecuencia que caracteriza al SAProg por inducción aguda. Y lo hemos comparado en sus características EEG con otros síndromes de abstinencia como: el síndrome de abstinencia a GABA (SAG), el síndrome de abstinencia a Dz (SAD) y el síndrome de abstinencia a P inducida en forma crónica (SAProg crónico).

Los resultados de la presente tesis mostraron cambios EEG generados por la abstinencia aguda a diversos agonistas del receptor  $GABA_A$ . Identificamos claramente que la actividad cortical se incrementa por el efecto de la interrupción de su aplicación aguda-intracortical (GABA y P) ó crónica-sistémica (Dz ó P). Es evidente el incremento de la excitabilidad neuronal de estas abstinencias cuya característica principal es la aparición de complejos espiga-onda de alta frecuencia y de gran amplitud, que se modifican progresivamente después de la inducción. De acuerdo a esta característica electrofisiológica nosotros proponemos que la abstinencia a P es la que tiene mayor excitabilidad en comparación a la generada por el Dz y el GABA.

### 10.1 Análisis espectral de Wavelets

No obstante que la aplicación del análisis del dominio de frecuencia por medio de la transformada de Fourier, obtiene una serie de números que representan a los componentes de la frecuencia, esta colección de datos tiene un inconveniente metodológico, las características estadísticas de la señal deben ser las mismas en cualquier punto; es decir, el análisis de Fourier es excelente para una señal estacionaria en términos de su distribución de amplitud en un momento determinado. El EEG de una crisis convulsiva o de una hiperexcitabilidad neuronal - como en el caso de esta tesis - no cumple estrictamente con este criterio. Existen eventos transitorios como complejos espiga-onda, descargas de potenciales

sinápticos poblacionales que no son estacionarias; es decir, no están sincronizadas como el que se tiene en la línea base o en condiciones control (Fernández- Mas *et al.*, 1998). Esta es la razón por la cual en este trabajo se utilizó el análisis de frecuencia de Wavelets.

Las señales aleatorias que se presentan en esta tesis son los complejos epileptiformes denominados espiga-onda, ocurren repentinamente en algún tramo del EEG y no son periódicas por lo que no pueden analizarse con el mismo análisis de distribución, el análisis de la señal eléctrica por el algoritmo de Wavelets representa una de las mejores estrategias matemáticas para cuantificar los cambios en forma aguda y crónica de la señal eléctrica del cerebro.

## **10.2 Neurobiología de los cambios del SAG**

Datos previos de nuestra línea de investigación indican que el SAG inducido con la misma concentración (5 mM) y velocidad de instilación (3  $\mu$ l/h) durante 2 h, se obtiene una hiperexcitabilidad de la corteza cerebral instilada con una latencia promedio de 90 minutos y una duración de 7 días (Calixto *et al.*, 1995). El análisis de resultados de la presente tesis muestra que la latencia fue de  $15\pm 5$  min de la primera espiga (figuras 7 y 8). Estas diferencias estriban en algunos factores como el tamaño de la cánula de instilación (una cánula de mayor diámetro lesiona más), la profundidad de la instilación (instilación en capas profundas de la corteza cerebral generan una mayor hiperexcitabilidad); es decir, en la presente tesis la zona de lesión cerebral es mayor que en los trabajos previamente publicados.

La neurobiología de la inducción del SAG indica que se generan varios cambios en ambos componentes de la sinapsis. En la membrana presináptica disminuye la síntesis y la liberación de GABA en los estadios tempranos de la hiperexcitabilidad neuronal y en consecuencia, la cantidad de GABA es dos veces menor que en condiciones basales (Salazar, 1994). En el componente postsináptico hay una disminución en el número de receptores GABA<sub>A</sub> asociado a



cambios en expresión de subunidades del receptor ionotrópico, como lo son los cambios en la expresión de la subunidad  $\alpha$  que reducen significativamente la sensibilidad farmacológica del receptor (Brailowsky *et al*, 1988; Will *et al*, 1988, Casasola *et al*, 2002).

La fenomenología de la inducción del SAG indica claramente que primero son los cambios en la neurotransmisión GABAérgica y posteriormente se instalan modificaciones de otras neurotransmisiones (Brailowsky, 1991); es decir, la actividad epileptiforme (complejos espiga-onda) que se observa en el EEG después de la interrupción de la infusión de GABA depende una modificación de la actividad sináptica que se inicia por la disminución del tono GABAérgico al cual se le agrega el incremento de la actividad de los receptores a glutamato (NMDA y AMPA), asociado al aumento del tono colinérgico y adrenérgico, sin modificaciones en la actividad serotoninérgica, cambios en la sensibilidad de algunos canales iónicos sensibles a voltaje como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Si bien, la ventana temporal de los sucesos sináptico-moleculares son difíciles de indicar nuestra línea investigación muestra que las primeras 24h el evento depende exclusivamente de los cambios de la neurotransmisión GABAérgica (Araneda *et al.*, 1994).

Las neuronas de la corteza somatomotora instilada, foco de la descarga epiléptica, presentan un incremento en su actividad, una disminución de la actividad de los receptores muscarínicos, un incremento en la activación de receptores nicotínicos, una disminución de la corriente saliente de  $\text{K}^+$ , un incremento de la expresión de la enzima acetilcolinesterasa, así como, un aumento del consumo de glucosa. En contra parte, la corteza que solo es instilada con el vehículo del GABA (solución salina) no tiene modificaciones electrofisiológicas (Silva-Barrat *et al.*, 2005; Silva-Barrat *et al.*, 2001; Silva-Barrat *et al.*, 1995; Araneda *et al.*, 1994; Menini *et al.*, 1991).

### **10.3 Relación amplitud y número de eventos espiga-onda en el SAG**

Una de las aportaciones de esta tesis fue la cuantificación selectiva del incremento en la actividad cortical en el cerebro de la rata al cual se le interrumpió la instilación GABA. El análisis de Wavelets indica claramente que la hiperexcitabilidad neuronal máxima se encuentra en un espectro de potencia entre 4-15 Hz (Fig.7). Además, se analizó el hemisferio contralateral, a través de esta cuantificación se pudo identificar que durante el SAG el día de la inducción (*día 0*) se propaga la actividad epileptiforme en el EEG: **1)** con amplitud y número de complejos espiga-onda semejantes a los presentes en la corteza somatomotora instilada (derecha; Figs.8 y 9). No obstante que el hemisferio instalado tiene una gran actividad, la evolución temporal de la abstinencia muestra que el hemisferio contralateral es silente después del primer día de inducción de la abstinencia y **2)** el aumento de la amplitud del EEG tiene una relación proporcional con la presencia de el número de complejos espiga-onda durante el SAG, como lo propuso Brailowsky y colaboradores (1988) la actividad del SAG es una actividad epileptiforme de gran amplitud en sus estadios iniciales.

### **10.4 Modificaciones de la neurotransmisión GABAérgica inducidas por el SAD**

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto que el cerebro de las ratas es susceptible a modificar su excitabilidad por la interrupción de la administración de Dz y el impacto que esto tiene en la neurotransmisión GABAérgica. Este modelo basado en una hiperexcitabilidad neuronal por inducción de una abstinencia a un fármaco GABAérgico, en la exposición crónica y su posterior interrupción de su administración en forma abrupta, tiene semejanza con las características electrofisiológicas que desarrolla el SAG (Calixto *et al*,

2000; Brailowsky *et al*, 1991; 1988; 1987; Casasola *et al*, 2004; Brailowsky *et al*, 1988, Calixto *et al*, 2000; Mellerio, 1980; Smith *et al*, 1998; Smith *et al*, 2007).

### **10.5 Mecanismos moleculares y sinápticos inducidos por el SAD**

La exposición crónica de algunos moduladores alostéricos positivos como el Dz y los neuroesteroides incrementan la expresión de la subunidad  $\alpha 4$  del receptor GABA<sub>A</sub>, este evento se asocia a una disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha 1$ . Cuando la duración de las administraciones de estos agonistas es mayor a un mes, existen cambios en las subunidades  $\alpha 5$ , reduciéndose su expresión mientras hay un incremento en la expresión de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  (Ator *et al*, 2010). Las abstinencias a algunas Benzodiacepinas (Clonazepam y Dz) también se han relacionado con un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica (incremento de la función de los receptores AMPA (Xiagnk y Tietz, 2007) y NMDA (Shen y Tietz, 2011; Izzo *et al*, 2001; Allison *et al*, 2005; Allison y Pratt, 2006; Steppuhn y Turski, 1993).

Otras neurotransmisiones que pueden estar involucradas en la neurobiología del incremento de la excitabilidad neuronal inducida por la abstinencia a Dz, es el incremento de la actividad serotoninérgica (Langen y Rundfeldt, 2007) asociado con una disminución de la actividad colinérgica (Rada y Hoebel 2005).

### **10.6 Cambios en el EEG durante y después del tratamiento con Dz**

El tratamiento con Bzs utilizado en forma breve es capaz de ser ansiolítico y sedativo. Sin embargo, cuando el tratamiento es crónico los efectos electroencefalográficos adversos pueden detectarse cuantitativamente. Estos datos de hiperexcitabilidad en la abstinencia en el EEG (espigas-onda e incremento en la amplitud) se asocian con tolerancia y dependencia al fármaco.

El SAD se asemeja mucho en su inicio, manifestación EEG y clínica a otras abstinencias desarrolladas por fármacos GABAérgicos como lo son: el alcohol y el GABA (Schacht *et al*, 2011; Díaz *et al*, 2011; Calixto *et al*, 2000; Casasola *et al*, 2004). Por lo que sugerimos que los mecanismos de inicio de la hiperexcitabilidad neuronal que se cuantifican en el EEG tienen similitudes en la etiopatogenia que desarrolla el SAD: 1) cambios presinápticos (Katsura *et al*, 2007) a) disminución de la síntesis y liberación de GABA (Calixto *et al*, 2000), por cambios en la GAD (Salazar *et al*, 1994) y en el transportador de GABA (Kammerer *et al*, 2011), b) Modificaciones en la conductancia de  $K^+$  (Kammerer *et al*, 2011). 2) Modificaciones en la membrana postsináptica a) cambios en la sensibilidad y composición del receptor  $GABA_A$  (Smith *et al*, 1998; 2007) b) disminución en la expresión de los receptores  $GABA_A$  (Casasola *et al*, 2004) y c) Incremento de las corrientes de  $Ca^{2+}$  post-sinápticas (Ator *et al*, 2010; Katsura *et al*, 2007; Brailowsky, 1991; Calixto *et al*, 2000).

Para la fase de mantenimiento de la abstinencia, otras neurotransmisiones se involucran. Como ya se mencionó la neurotransmisión glutamatérgica, dopaminérgica, serotoninérgica y adrenérgica (Caputo y Bernardi, 2010; Uzun *et al*, 2010; Authier *et al*, 2009) participan en el mantenimiento asociado al incremento de la conductancia de  $Ca^{2+}$  postsináptico, por lo que se sugiere que los mecanismos de inicio y propagación de distintas vías neuronales se vean favorecidos para generar reverberancia que sobre-excite aún más la actividad neuronal por la caída del sistema GABAérgico.

La actividad EEG es la suma de la interacción de miles de poblaciones neuronales corticales, las cuales son excitadas por glutamato e inhibidas por el GABA. Modificar el grado de excitabilidad cortical por alguno de estos dos agentes repercute en la excitación del SNC (crisis convulsivas o disminución de la actividad, respectivamente). La pérdida de este equilibrio es frecuente en los mamíferos y es uno de los factores por los cuales el cerebro de los humanos es

vulnerable a las modificaciones sinápticas para adaptarse a diversos procesos externos (Gonzalez, 1998). Este equilibrio precisamente se pierde con la aplicación y la interrupción abrupta del Dz. Miles de poblaciones neuronales son inhibidas por la aplicación de la Benzodiacepina, de ahí radica que la actividad electroencefalográfica aumente su amplitud. La aplicación de Dz permite la sincronización, sin embargo, este proceso es el que modifica la neurotransmisión GABAérgica a mediano plazo (la aplicación i.p. durante 10 días es suficiente para dejar modificaciones sinápticas que empiezan a manifestarse por la interrupción de la aplicación del fármaco). En estas condiciones farmacológicas y fisiológicas, la organización biofísica y de conexión neuronal va haciendo que neurotransmisiones y moduladoras se involucren para generar un fenómeno que desde el punto de vista electrofisiológico, es el resultado de que cada vez más poblaciones neuronales se organicen en la sincronización de disparo, generando mayor hiperexcitabilidad y favoreciendo la liberación de neurotransmisores asociados al mantenimiento del SAD.

Los mecanismos biofísicos que modifican la fisiología neuronal repercuten a largo plazo a cambios anatómicos, que a su vez van favoreciendo más la excitabilidad neuronal (Vivash *et al*, 2011; Liu *et al*, 1999). Existen evidencias de reorganización del árbol dendrítico y cambios en la orientación y contracción del axón cuando los sistemas de excitación y de inhibición se pierden (Liu *et al*, 1999). Semejante a lo que sucede en las epilepsias, en el SAD se perpetúan los cambios sinápticos y biofísicos: conexiones dendríticas y la aparición del *sprouting* (cambios en la morfología y la conexión del axón), esto es un proceso de plasticidad cerebral negativa que se ha asociado también a las adicciones.

### **10.7 Desarrollo de la abstinencia a Progesterona**

Evidencias en el campo de las neurociencias muestran que la P es capaz de generar síndromes de abstinencia como los que desarrollan las benzodiacepinas y el alcohol (Khisti *et al*, 2005; Kaufman *et al*, 2010; Gonsalves y Gallager, 1986; Ward *et al*, 1998; Toki *et al*, 1996). Desde hallazgos clínicos en el

humano, como es el caso de la epilepsia catamenial, en el cual la disminución abrupta de la concentración de P desarrollan 1) un incremento en aparición de los episodios convulsivos así como 2) un aumento en su gravedad en la etapa estrogénica, en contraste, en la etapa progestacional hay disminución de ambos eventos; esto indica claramente como el fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal se reduce en presencia de P. Otros trastornos clínicos relacionados con la abstinencia a P son a) el trastorno ó disforia del síndrome premenstrual y b) la depresión posparto. Ambos eventos indican claramente que la ausencia de P se asocia en forma proporcional a la aparición de ansiedad, irritabilidad, labilidad emocional y anhedonia (Reddy *et al*, 2009; Quigg *et al* 2009; Zheng 2009; Gutiérrez *et al* 2000, Maguire *et al*, 2009). El común denominador de estos trastornos es el incremento crónico de los niveles plasmáticos de P y una súbita disminución.

El metabolito reducido de la P, la AloP, es en realidad la molécula que presenta la modulación alostérica positiva sobre el receptor GABA<sub>A</sub> (Hosie *et al*, 2006, 2008; Akk *et al*, 2004, 2005; 2010), dos pasos enzimáticos son fundamentales para esta biotransformación, este neuroesteroide incrementa significativamente las corrientes de Cl<sup>-</sup> generadas por el GABA, lo cual incrementa la actividad inhibitoria, hipnótica, sedativa, ansiolítica y antiepiléptica; sin embargo, la exposición crónica de P genera modificaciones en el receptor (cambio de expresión de subunidades que lo hacen menos sensible) lo cual, contribuye a una desensibilización en sus efectos (Smith. S *et al* 2005, 2003, 2007; Akk *et al*, 2010). Es esta abrupta disminución de los niveles de P lo que induce a largo plazo una disminución en la actividad GABAérgica, lo cual puede contribuir directamente con el incremento de la susceptibilidad a tener una crisis convulsiva o generar un síndrome de abstinencia. Si bien estos datos se han identificado plenamente en humanos, muchos modelos de laboratorio han encontrado el sustrato fisiológico de lo que sucede en el cerebro de grandes mamíferos en relación a los neuroesteroides y los efectos a corto-largo plazo de la P (Moran y Sheryl, 1998; Reddy *et al*, 2001; Smith. S *et al* 2005).

Nuestros resultados muestran la susceptibilidad de desarrollar un SAProg crónico (Fig. 13.), estos hallazgos evidencian claramente que la actividad cortical se modifica por la exposición farmacológica de P en ratas macho. Sin embargo, una de las aportaciones más importantes que tiene esta tesis es el hecho de que se puede desarrollar una actividad epileptiforme por la aplicación intracortical-aguda de P. La administración única de dos horas y la súbita interrupción de la aplicación intracortical del neuroesteroide es suficiente para generar un foco epiléptico en la corteza cerebral y en consecuencia la aparición de actividad epileptiforme con gran propagación al hemisferio contralateral del que recibió la instilación de P. Éste resultado es inédito en el campo de las neurociencias. La forma aguda de inducción de una actividad epileptiforme por P indica claramente que la neurotransmisión GABAérgica se modifica en forma rápida aunque es gradualmente reversible, semejante a lo que induce el GABA (Calixto, 2012). Esto indica claramente que el cerebro de mamíferos es vulnerable a la aplicación aguda de un modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub>, que no obstante al incremento de la actividad GABAérgica genera, paradójicamente, desensibilización de este neurotransmisor y predispone al sustrato neuronal a una hiperexcitabilidad.

Estudios previos a esta tesis muestran que la administración crónica ó aguda de un modulador alostérico positivo del receptor GABA<sub>A</sub> induce abstinencia, esto es fundamental para la expresión, el mantenimiento y la duración del síndrome (Brailowsky *et al*, 1988; Authier *et al*, 2009; Gangisetty y Reddy, 2010; Moran y Sheryl, 1998; Reddy *et al*, 2001). Nosotros hemos identificado que la administración aguda de P genera latencias cortas y un mantenimiento de la abstinencia prolongado. Esto indica que la P en forma aguda interactúa más con el receptor GABA<sub>A</sub>, no obstante la administración crónica de P puede estar modulando la actividad de un neurotransmisor inespecífico reduciendo o incrementando la liberación de diversos neurotransmisores y la conexión neuronal

a través de cambios en la expresión genética (Rupprecht *et al*, 1993; Mani, 2003; Edwards y Epps, 2000, Edwards y Wardell, 2003).

La diferencia en la manifestación electrofisiológica de las abstinencias a P se debe a la farmacocinética y farmacodinámica de la aplicación del neuroesteroide. La abstinencia crónica refiere una administración continua de P durante siete días, en la que es evidente que el esteroide ocupa, se metaboliza e incluso se almacena en sitios anatómicos como el tejido adiposo, el hígado, y el cerebro. Su bio-transformación es gradual y su eliminación es a mediano-largo plazo a partir del hígado, glándulas suprarrenales y tejido adiposo (Pennell, 2009; Reddy, 2009). En contraste, la administración intracortical de P tiene un efecto directamente sobre las neuronas, modificándose su estructura en dos pasos enzimático para convertirse en AloP, con ello el neuroesteroide tiene un efecto directo sobre el mismo sustrato biológico que condiciona la aparición del incremento en la actividad neuronal (Balboa *et al*, 2006; Chisari *et al*, 2009, 2010; Hosie *et al*, 2006, 2008; Akk *et al*, 2004, 2005; 2010; Tsutsui *et al*, 1999; Lambert *et al*, 2009; Belelli *et al*, 2006).

La línea de investigación de Sheryl S. Smith ha propuesto que los eventos relacionados con la P en el cerebro son debidos directamente a la modificación en la estructura y en la función del receptor GABA<sub>A</sub>, identificando con ello que poseen una actividad alostérica positiva sobre receptor cambiando la sensibilización del receptor sin modificar la corriente al pico de la corriente de Cl<sup>-</sup> (Smith. S *et al* 2005, 2003, 2007). En la abstinencia disminuye este factor de potenciación sobre la actividad GABAérgica (Hosie *et al*, 2006, 2008; Akk *et al*, 2004, 2005; 2010).

Diversos estudios muestran que la síntesis de la AloP depende directamente de la P sintetizada en el sistema nervioso central, pero que también puede ser sintetizada a partir de la P provenientes de gónadas y glándulas suprarrenales (Hosie *et al*, 2006, 2008; Akk *et al*, 2004, 2005; 2010; Tsutsui *et al*, 1999; Pennell, 2009; Reddy, 2009). Estudios en relación a este punto muestran



que la presencia de finasteride, un inhibidor de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa es capaz de disminuir la abstinencia a P, debido a que la P disminuye su transformación el AloP. Diversos estudios muestran que otros agonistas del receptor, como lo es la DHP, THDOC, DHEA y metabolitos reducidos de la testosterona como el androstanediol tienen una modulación farmacológica menos potente a la que realiza la AloP, por lo cual sugerimos que el efecto de la P identificado en esta tesis puede deberse más al efecto de la bio-transformación de P en AloP, que al efecto de la P misma (Lambert *et al*, 2009; Belelli *et al*, 2006; Reddy y Jian, 2010; Pennell, 2009; Reddy, 2009).

Estudios posteriores de nuestra línea de investigación deben mostrar cuáles son las diferencias y las analogías de los cambios en el receptor GABA<sub>A</sub> cuando la P se administra en forma crónica con respecto a la administración aguda. Si bien las manifestaciones pueden ser semejantes queda de manifiesto que la abstinencia aguda de P es la que manifiesta la forma más hiperexcitable de la actividad cortical comparada con la que se desarrolla por GABA o por Dz.

La P es un neuroesteroide sintetizado en el cerebro de mamíferos hembras y machos independientemente de la síntesis en gónadas o glándulas adrenales (Belelli *et al*, 2006; Balboa *et al*, 2006; Lambert *et al*, 2009). Son diversos los estudios que muestran claramente la modulación de este neuroesteroide sobre la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica en latencias y duraciones cortas. Además de que modifican la liberación de diversos neurotransmisores como la dopamina, la serotonina y la acetilcolina. Es decir, la actividad de este neuroesteroide es la modulación de la excitabilidad neuronal en períodos cortos a través de modificar la actividad de diferentes neurotransmisiones. Además, la P puede modificar la expresión genética de las neuronas a largo plazo. La P se encuentra involucrada en la modulación de la conducta sexual a través de efectos genómicos (mediante la interacción de complejos hormona receptor y cambios en expresión genética; Rupprecht *et al*, 1993; Mani, 2003; Edwards y Epps, 2000, Edwards y Wardell, 2003). La propuesta de este trabajo es que la P tiene efectos

genómicos a mediano-largo plazo y que los efectos vistos por la infusión intracortical de P son efectos rápidos debido a que se integra rápidamente al sistema nervioso central se bio-transforma e induce modificaciones sinápticas inicialmente en la neurotransmisión GABAérgica. Sin descartar que para el mantenimiento y la duración de la abstinencia también se modifican otras neurotransmisiones y se generen cambios en la expresión de proteínas sinápticas.

Evidencias moleculares, en la abstinencia crónica a P muestran que la modificación de la cinética de activación del receptor GABA<sub>A</sub>, se debe a cambios en la expresión de subunidades del receptor, específicamente un recambio de la subunidad  $\alpha 1$  (down-regulation) por un incremento en la expresión de la subunidad  $\alpha 4$  en el espacio sináptico y un incremento en la expresión de la subunidad  $\delta$  en el espacio extrasináptico, lo cual contribuye farmacológicamente a una disminución de la sensibilidad del receptor. En resumen estos efectos son: 1) cambio en la activación, 2) modificación de la fosforilación y 3) disminución del cambio conformacional del receptor en presencia del neurotransmisor (Maguire y Mody, 2009; Gangisetty *et al*, 2010; Maguire *et al*, 2009; Lawrence *et al*, 2010; Krishek *et al*, 1996; Mc Donald *et al*, 1998; Hosie *et al*, 2003). La propuesta de esta tesis, es que la abstinencia a P inducida en forma aguda tiene mayores manifestaciones electrofisiológicas que la abstinencia crónica debido a que la activación que genera el neuroesteroide sobre el receptor es directa en el cerebro, asimismo el procesamiento y la depuración que tiene el esteroide es en la misma corteza cerebral.

### **10.8 Análisis de la relación espiga-onda y la potencia de diferentes síndromes**

Los resultados de la presente tesis muestran que el síndrome de abstinencia P inducida en forma aguda (instilación intracortical) es el de mayor potencia a nivel del EEG que los otros síndromes de abstinencia que se cuantificaron en este trabajo. La manifestación electroencefalográfica del SAProg

agudo indica que el día de su inducción tuvo 3.6 eventos espiga-onda/seg. El SAG, 0.9 espigas-ondas/seg en tanto que el SAD fue de 0.5 espigas-ondas/seg, finalmente el SAProg crónico manifestó 0.4/seg. Es decir que el SAProg agudo es cuatro veces más potente que el SAG, siete veces más potente que el SAD y nueve veces más potente que el SAProg inducido en forma crónica.

Si bien la comparación directa entre el SAProg agudo y el SAG hay diferencias, queda claro que la abstinencia a P aguda es de mayor potencia. La P administrada en esta forma y a esta concentración indica claramente que su abstinencia tiene efectos mayores que los que genera su neurotransmisor endógeno. Ambas concentraciones pueden alcanzarse en forma fisiológica en condiciones extremas de excitabilidad como por ejemplo la epilepsia y el traumatismo craneoencefálico (Möhler, 2011). En relación a los otros dos síndromes, queda de manifiesto que la aplicación crónica de P y Dz son muy semejantes en su frecuencia de aparición de descargas espiga-onda, ambas moléculas fueron administradas en forma crónica, el Dz en forma i.p. y la P en forma s.c, sin embargo, la desconexión de la administración de ambos tratamientos crónicos su abstinencia se manifiesta en forma semejante en relación a la presencia de el número de complejos epilépticos.

## 11. CONCLUSIONES

1. La interrupción repentina de la administración aguda intracortical de P, induce la aparición de hiperexcitabilidad neuronal.
2. Esta abstinencia es de mayor potencia que la inducida por otros agonistas del receptor GABA<sub>A</sub>.
3. El SAProg agudo presenta una mayor frecuencia de descargas epileptiformes.
4. El SAProg representa un modelo de plasticidad neuronal negativo y un nuevo bioensayo para estudiar abstinencias que regulan la neurotransmisión GABAérgica.

## 12. Referencias

Academia Nacional de Medicina. (1999) Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. *National Research Council*. 1-84.

Akk G, Bracamontes J. R, Covey D. F. (2004) Neuroactive steroids have multiple actions to potentiate GABA<sub>A</sub> receptors. *J Physiol*. 558(1): 59-74.

Akk G, Covey. D. F, Evers A. S, Mennerick S, Zorumski C. F, Steinbach J. H. (2010) Kinetic and structural determinants for GABA-A receptor potentiation by neuroactive steroids. *Current Neuropharmacology*. 8:18-25.

Akk G, Shu H-J, Wang C, Steinbach J. H. (2005) Neurosteroid access to the GABA<sub>A</sub> receptor. *The journal of neuroscience* 25(50): 11605-11613.

Allison C, Pratt JA, Ripley TL, Stephens DN. (2005) AMPA receptor autoradiography in mouse brain following single and repeated withdrawal by Dz. *Eur J Neurosci* 21: 1045-1056.

Allison C, Pratt JA. (2006) Differential effects of two chronic Dz treatment regimes on withdrawal anxiety and AMPA receptor characteristics. *Neuropsychopharmacol* 31: 602-619.

Alvarenga JM, Loyola F, Firmo JO, Lima-Costa MF, Uchoa E. (2007) Prevalence and sociodemographic characteristics associated with benzodiazepines use among community dwelling older adults: The Bambuí Health and Aging Study (BHAS). *Rev Bras Psiquiatr* Oct 31: 35-46.

Araneda S, Silva-Barrat C, Menini C, Naquet R. (1994) High Expression of Noradrenaline, Choline Acetyltransferase and Glial Fibrillary Acid Protein in

The Epileptic Focus Consecutive to GABA Withdrawal. An Immunocytochemical Study. *Brain Res.* 655(1-2): 135-146.

Ator NA, Atack JR, Hargreaves RJ, Burns HD, Dawson GR. (2010) Reducing abuse liability of GABAA/benzodiazepine ligands via selective partial agonist efficacy at alpha 1 and alpha 2/3 subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 332(1): 4-16.

Authier N, Balaysaac D, Sautereau M, Zangarelli A, Courty P, Somogyi AA, Vennat B, Llorca PM, Eschalier A. (2009) Benzodiazepine dependence: focus on withdrawal syndrome. *Ann Pharm Fr* 67(6): 408-413.

Balboa R. C, Pinna G, Zhubi A, Maloku E. (2006) Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. 39(103): 14602-14607.

Baptista FL, Ferreira R, Cabral A, Moreno CV, Lira BM, Nobre MJ. (2007) Brainstem areas activated by Dz withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Res* 1166.

Belleli, D., Lambert J (2005). Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABAA receptor. *Nature reviews/Neuroscience.* (6): 565-575.

Belleli D, Casula A, Ling A, Lambert JJ. (2002) The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA<sub>A</sub> receptors. *Neuropharmacology* 43: 43-651-661.

Belleli D, Herd M. B, Mitchell E. A. (2006) Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience.* 138: 821-829.

- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> Receptors Subtypes. *TINS*, 11(3).
- Bowery, N. (1990). GABA Transporter Protein Cloned from de Rat Brain. *TIPS*, 11: 435- 437.
- Brailowsky, S, Silva- Barrat. C., Menini, C., Riche, D. y Naquet, R. (1989). Effects of Localized, Chronic GABA Infusions into Different Cortical areas of the Photosensitiva Baboon, Papio Papio. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 72: 147-156.
- Brailowsky, S. (1991). The GABA-Withdrawal Syndrome. *Proc West Pharmacol Soc* 34: 227-228.
- Brailowsky, S. (2000). Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología. México: Fondo de Cultura Económica.
- Brailowsky, S., Kinumoto, M., Menini, C., Silva- Barrat, C., Riche, D. y Naquet, R. (1988). The GABA-Withdrawal Syndrome: a New Model of Focal Epileptogenesis. *Brain Research*, 442: 175-179.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C. y Naquel, R. (1990). Electroencephalographic Study of the GABA-withdrawal Syndrome in Rats. *Epilepsy*, 31: 369-377.
- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C. y Naquel, R. (1987). Epileptogenic Gamma-Aminobutyric Acid Withdrawal Syndrome after Chronic, Intracortical Infusion in Baboons. *Neuroscience Letters*, 74: 75-80.
- 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

- Brussard AB, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting- Vermeulen JW, Voorn P, Smith AB, Bicknell RJ, Herbison AE. (1997) Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA-A receptor subunit expression. *Neuron*. 19: 1103-1114.
- Calixto E, López-Colome AM, Casasola C, Montiel T, Bargas J. (2000) Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Res* 39: 13-26.
- Calixto, E. (2001). *Incremento en la Excitabilidad de La Corteza Cerebral Por Efecto de la Privación de GABA o Benzodiazepinas. Efecto Coadyuvante de los Neuroesteroides*. Tesis de Doctorado, UNAM, Ciudad de México, México.
- Calixto, E. (2012). La abstinencia a GABA: 20 años de un modelo de hiperexcitabilidad neuronal. *Salud Mental*. 35(5) 427-434.
- Calixto, E., Montiel, T., Lemini, C. Brailowsky, S. (1995). Allopregnanolone Potentiates a GABA-withdrawal Syndrome in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience Letters*, 195: 73-76.
- Caputo F, Bernardi M. (2010) Medications acting on the GABA system in the treatment of alcoholic patients. *Curr Pharm Des*. 16 (19): 2118-25.
- Carlson, N. (2006). *Fisiología de la Conducta*. México: Pearson, 120-140.
- Casasola C, Montiel T, Calixto E, Brailowsky S. (2004) Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 126: 163-171.
- Casasola, C., Bargas, J., Arias-Montaño, J.-A., Calixto, E., Montiel, T., Galarraga, E. y Brailowsky, S. (2002). Hippocampal Hyperexcitability Induced by GABA Withdrawal Syndrome is due to Down- Regulation of GABA Receptors. *Epilepsy Research*, 47: 257- 271.



- Chisari M, Eisenman L. N, Krishan K. (2009) The influence of neuroactive steroids lipophilicity on GABA A receptor modulation: Evidence for a low-affinity interaction. *J Neurophysiol.* 102: 1254-1264.
- Chisari M, Shu H-J, Taylor A, Steinbach J. H, Zorumski C. F, Mennerick S. (2010) Structurally diverse amphiphiles exhibit biphasic modulation of GABA<sub>A</sub> receptors: similarities and differences with neurosteroids actions. *British journal of pharmacology.* 160: 130-141.
- Compagnone, N. A., and Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.* 21:1–56.
- Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L., and Mellon, S. H. (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2689–2696.
- Concas A, Mostallino MC, Porcu P, Folesa P, Barbaccia ML, Trabucchi M, Purdy RH, Grisenti P, Biggio G. (1998) Role of brain allopregnanolone in the plasticity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13284-13289.
- Corpechot, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjoval, J., Vihko, R., Baulieu, E. E., and Robel, P. (1983). Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res.* 270, 119–125.
- Cortés- Romero, C., Galindo, F., Galicia- Isasmendi, S. y Flores A. (2011). GABA: ¿Dualidad Funcional? Transición durante el Desarrollo. *Revista de Neurología.* 52: 665- 675.
- Depoortere H, Decober M, Honoré L. (1983) Drug effects on the various species of laboratory animals. *Neuropsychobiol* 9: 244-249.

- Dhillon S, Oxley J, Richens A. (1982) Bioavailability of Dz after intravenous, oral and rectal administration in adult epileptic patients. *Br. J. clin. Pharmacol* 13: 427-432.
- Diaz MR, Christian DT, Anderson NJ, McCool BA. (2011) Chronic ethanol and withdrawal differentially modulate lateral/basolateral amygdala paracapsular and local GABAergic synapses. *Pharmacol Exp Ther* 337(1): 162-170.
- Doble A, Martin I. (1996) The GABA<sub>A</sub> benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. In: Neuroscience Intelligent Unit. Champan, Hill., eds). USA.
- Edwards D. P, Wardell S. E. (2003) Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J Steroid Biochemistry and molecular biology*. 83:173-186.
- Edwards H. E. Epps T. (2000) Progestin receptors mediate progesterone suppression of epileptiform activity in tetanized hippocampal slices *in vitro*. *Neurosci*. 101(4): 895-906.
- Feldman, A., Meyer, C., Quesner, C. (1996). Principles of *Neuropsychopharmacology*. Academic Press.
- Fernández-Mas, R., Valdés, A., Martínez, A., Magdaleno, V., Almazán S., Martínez, D. y Fernández- Guardiola, A. (1998). Visualización Gráfica de las Transiciones del Sueño en el Hombre: Métodos de Representación Tridimensional. *Salud Mental*, 6: 27- 32.
- Foley CM, Stanton JJ, Price EM, Cunningham JT, Hasser EM, Heesch CM. (2003) GABA-A  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 receptor subunit expression in rostral ventrolateral medulla in nonpregnant and pregnant rats. *Brain Res*. 975: 196-206.

- 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<sub>A</sub> receptor and its prevention by Dz or gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 130-137.
- Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, Massa F, Desole MS, Carta M, Busonero F. (2001) Increase in expression of the GABA<sub>A</sub> receptor alpha 4 subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists. *Brain Res Mol Brain Res* 92: 138-148.
- 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 Dz 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.
- Foster, A. y Kemp, J. (2006). Glutamate- and GABA- based CNS Therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 7-17.
- Frye CA, Bayon LE. Seizure activity is increased in endocrine states characterized by decline in endogenous levels of the neurosteroid 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP. *Neuroendocrinology*. 68: 272-280.
- Frye CA, Reed TA. (1998) Androgenic neuroactive steroids: anti-seizure effects in an animal model of epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*. 23: 385-399.
- Fukuda, H., Brailowsky, S., Menini, C., Silva- Barrat. C., Riche, D. y Naquet, R. (1987). Anticonvulsant Effect of Intracortical, Chronic Infusion of GABA in Kindled Rats: Focal Seizures upon Withdrawal. *Experimental Neurology*, 98: 120-129.

- Gangisetty, O., Reddy, D. (2010). Neurosteroid withdrawal regulates GABA-A receptor  $\alpha$ 4-subunit expression and seizure susceptibility by activation of PR-independent EG3 pathway. *Neuroscience*. 170(3): 865–880.
- Garcia-Ugalde G, Galarraga E, Bargas J, Brailowsky S. (1992). Hyperexcitability of Hippocampal CA1 Region in Brain Slices after GABA Withdrawal. *Neuroscience Letters*. 147(2):229-32.
- Gee KW, Bolger MB, Brinton RE, Coirini H, McEwen BS. (1988) Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther*. 246: 803- 812.
- Gonsalves S. F, Gallager D. W. (1986) Time course for development of anticonvulsant tolerance and GABAergic subsensitivity after chronic Dz. *Brain research*. 405:94-99.
- González LP. (1998) Electrophysiological changes after repeated alcohol withdrawal. *Alcohol Health Res World* 22(1): 34-37.
- Goodman GA, Ruddon RW, Molinoff PB, Limbird LE, Hardman JG. (1996) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill interamericana. Novena edición, vol. II y II.
- Greenblatt DJ, Shader R.I. (1978) Dependence tolerance, and addiction to benzodiazepines: clinical and pharmacokinetic consideration. *Drug Metab. Rev* 8, 13-28.
- Gulinello M, Gong QH, Li X, Smith SS. (2001) Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha 4 GABA<sub>A</sub> receptor subunit levels in association with increases anxiety in the female rat. *Brain Res*; 910: 55-66.

- Gulinello M, Orman R, Smith SS. (2003) Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the alpha 4 subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor in the amygdala after progesterone withdrawal. *Eur J Neurosci.*; 17: 641-648.
- Gutiérrez A. G, Contreras C. M, Meza J. L. (2000) Como actúa la P sobre el sistema nervioso central. *Salud Mental* 23(002):42-48.
- Harrison NL, Majewska MD, Harrington JW, Barker JL. (1987) Structure-activity relationships for steroid interactions with the  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther.* 241: 346-353.
- Herd MB, Belleli D, Lambert JJ. (2007) Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors. *Pharmacol Ther.* 116: 20-34.
- Herrera, E. (1986). *Bioquímica*. México: Interamericana, 1160-1162.
- Hosie A. M, Clarke L, Silva H, Smart T. G. (2008) Conserved site for neurosteroid modulation of GABA<sub>A</sub> receptor. *Neuropharmacol.* 56:149-154.
- Hosie. M. A, Dunne. E. L, Harvey R. J, Smart T. G. (2003) Zinc-mediated inhibition of GABA<sub>A</sub> receptors: discrete bindings sites underlie subtype specificity. *Nature neuroscience* 6(4): 362-369.
- Hosie. M. A, Megan E. Wilkins, Helena M. A. da Silva & Trevor G. Smart (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABA-A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. Vol-444: 486-489.
- Hsu FC, Smith SS. (2003) Progesterone withdrawal reduces paired-pulse inhibition in rat hippocampus: dependence on GABA<sub>A</sub> receptor alpha 4 subunit up-regulation. *J Neurophysiol.* 89: 186-198.

- Impagnatiello F, Pesol C, Longone P, Caruncho H, Fritschy J, Costa E, Guidotti A. (1996) Modifications of  $\gamma$ -amino butyric acid A receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to Dz. *Mol Pharmacol* 49: 822-831.
- Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E. (2001) Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(6): 3483-8.
- Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E. (2001) Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (6): 3483-8.
- Jongsma ML, van Rijn CM, van Egmond J, van Shaikj WJ, Sambeth A, Coenen AM. (2000) The influence of Dz on the electroencephalogram-evoked potential interrelation in rats. *Neurosci Lett* 293(2): 83-86.
- Kammerer M, Rassner MP, Freiman TM, FeuerTJ. (2011) Effects of antiepileptic drugs on GABA release from a rat and human neocortical synaptosomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2001). *Principios en Neurociencia*. McGraw-Hill Interamericana.
- Katsura M, Shibasaki M, Kurokawa K, Tsujimura A, Ohkuma S. (2007) Up-regulation of L-type high voltage-gated calcium channel subunits by sustained exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepine in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 103(6): 2518-28.
- Kaufman K. R, Tanchuck M. A, Strong M. N, Finn D. A. (2010) Replacement with GABAergic steroid precursors restores the acute ethanol withdrawal profile in ADX/GDX mice. *Neurosci*. 166(1): 1-18.

- Khisti R. T, Boyd K. N, Kumar S, Morrow A. L. (2005) Systemic ethanol administration elevates deoxycorticosterone levels and chronic ethanol attenuates this response. *Brain research*. 1049: 104-111.
- King, S. R., Stocco, D. M., (2011). Steroidogenic acute regulatory protein expression in the central nervous system. *Frontiers in Endocrinology*. Vol.2, 1-6.
- King, S. R., Manna, P. R., Ishii, T., Syapin, P. J., Ginsberg, S. D., Wilson, K., Walsh, L. P., Parker, K. L., Stocco, D. M., Smith, R. G., and Lamb, D. J. (2002). An essential component in steroid synthesis, the steroidogenic acute regulatory protein, is expressed in discrete regions of the brain. *J. Neurosci*. 22, 10613–10620.
- Krishek. B. J, Amato A, Connolly. C. N, Moss. S. J, Smart. T. G. (1996) Proton sensitivity of the GABAA receptor is associated with the receptor subunit composition. *Journal of physiology* 492(2): 431-443.
- Krnjević, K . (1991). Significance of GABA in Brain Function. En: G. Tunnucliff & B.U. Raess, (Eds.), *GABA Mechanism in Epilepsy*. (pp. 47-87). Ney York: Wiley-Liss, Inc.
- Krnjević, K. (1984). Neurotransmitters in Cerebral Cortex: a General Account. En: E. G. Jones & A. Peter (Eds.), *Cerebral Cortex, Vol. 2. Functional Properties of Cortical Cells*. (pp.39-61), New York: Plenum Press.
- Krogsgaard- Larsen, P., Falch. E., Larsson, O., y Schousboe, A. (1987). GABA Uptake Inhibitors: Relevance to Antiepileptic Drug Research. *Epilepsy Res*,1. 77-93.
- Kulkarni SK, Reddy DS. (1995) Neurosteroids: a new class of neuromodulators. *Drugs Today* 31: 433-455.

- Lader, M. y File, S. (1987). The Biological Basis of Benzodiazepine Dependence. *Psychol Med* 17: 537-547.
- Lambert J. L, Cooper M. A, Simmons R. D. J. (2009) Neurosteroids: Endogenous allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors. *Psychoneuroendo*. 345: S48-S58.
- Lambert JJ, Belleli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA. (2003) Neurosteroids modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Prog Neurobiol* 71: 67-80.
- Lambert, J.J., Cooper, M.A., Simmons, R. D., Weir, C.J., and Belleli, D. (2009). Neurosteroids :endogenous allosteric modulators of GABA-A receptors. *Psychoneuroendocrinology* 34(Suppl.1), S48–S58.
- Lander M. (1994) Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur Neuropsychopharmacol* 4: 18-95.
- Langen B, Runfeldt C. (2007) ELB139 an agonist at the benzodiazepine binding site increases 5-HT in the striatum and prefrontal cortex of rats: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 86 (1): 79.85.
- Lawrence C, Martin. B. S, Sun. C, Williamson. J, Kapur. J. (2010) Endogenous neurosteroid synthesis modulates seizure frequency. *Ann Neurol*. 67(5): 689-693.
- 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.
- Liu Z, Yang Y, Silveira DC, Sarkisian MR, Tandon P, Huang LT, Stafstrom CE, Holmes GL. (1999) Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience* 92(4): 1443-54.



- Llorente MD, David D, Golden AG, Silverman MA. (2000) Defining patterns of benzodiazepines use in older adults. *J Geriatric Psychiatry Neurol* 13 (3): 150-160.
- Maguire J, Ferando I, Simonsen C, Mody I. (2009) Excitability changes related to GABA<sub>A</sub> receptor plasticity during pregnancy. *J. Neurosci.* 29(30): 9592-9601.
- Maguire J, Mody I. (2009) Steroid hormone fluctuation and GABA<sub>A</sub> R plasticity. *Psychoneuroendo.* 34:S84-S90.
- Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturates-like modulators of the GABA receptor. *Science.* 232: 1004-1007.
- Manchikanti L, Brown K, Pharm R, Singh V. (2002) National All Schedules Prescription Electronic Reporting Act (NASPER): Balancing Substance Abuse and Medical Necessity. *Pain Physician* 5(3): 294-319.
- Mandema JW, Danhof M. (1992) Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinetic* 23(2): 191-215.
- Mani S. (2003) G protein-coupled receptor signaling in neuroendocrine systems. Signalling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *J Mol Endo.* 30:127-137.
- Mark L, Waltzman M. (1999) Flunitrazepam: A review of "roofies". *Ped Emer Care* 5: 59-60.
- Martin IL. (1987) The benzodiazepines and their receptors: 25 years progress. *Neuropharmacol* 26: 957-970.

- Mathey HG. (1965) Treatment of autonomic functional syndromes with 7-chloro-1,3-dihydro-3-hidroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one. *Arzneimittelforschung* 15(4): 374-376.
- Mc Donald. B. J, Amato. A, Connolly. C. N, Benke. D, Moss. S. J, Smart. T. G. (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor  $\beta$  subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature neuroscience* 1(1): 23-28.
- 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*. (Ed, O'brien, C., Jaffe, J.) Raven press, New York: 231-252.
- Mellerio F. (1980) Contribution of electroencephalography in tranquilizer withdrawal syndrome. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 10 (1): 95-103.
- Menini, Ch., Mraovitch, S., Calando, Y., De La Sayette, V., Silva- Barrat, C., Brailowsky, S. y Seylaz, J. (1991). Metabolic Anatomy of the Local Epilepsy Produced by Cessation of Chronic Intracortical GABA Infusion in the Rat. *Neuroscience*: 41: 607-615.
- Midel, G., (1981). Pharmacology. USA: Englasood Cliffs.
- Miguel, A. (2012). *Administración Crónica de Dz como Promotor de Conductas Adictivas a Drogas en la Edad Adulta de la Rata*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Misztal-Dethloff B, Stepién H, Komorowski J. (2005) Effect of Dz and chlorpromazine on proliferative activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultures endothelial HECa10 cells in vitro. *Pharmacol Rep* 57(5): 670-674.

- Mohler H, Fritschy J. M, Rudolph U. (2002) A new benzodiazepine pharmacology. *J. Pharmacol Exp Ther* 300(1): 2-8.
- Mohler H. (2006) GABA<sub>A</sub> receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 731-740.
- Möler H. (2011) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology*. 62: 42-53.
- Montiel, T., Almeida, D., Rango, I., Calixto, E. Casasola, C. y Brailowsky, S. (2000). Long- Lasting Effects of GABA Infusion into the Cerebral Cortex of the Rat. *Neuroplasticity*. 7: 1-2.
- Moran M. H. Sheryl S. S. (1998) Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain research*. 807:84-90.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D. y Rodwell, V. (2001). *Bioquímica de Harper*. México: Manual Moderno.
- Nelson, H, Mandiyan, S. & Nelson, N. (1990). Cloning of the Human Brain GABA Transporter. *FEBS Lett* 269: 181-184.
- Oikkola KT, Ahonen J. (2008) Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol* 182: 335-360.
- Olsen, R. (2000). GABA is the Major Inhibitory Neurotransmitter in the Nervous System. *Neuropsychopharmacology*.
- Papadopoulos V. (1993) Peripheral-Type benzodiazepine/Dz binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocrine Reviews* 14(2): 222-240.
- Parker, K.; Lazo, J. y Brunton L. (2006). *Goodman&Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México: Mc Graw Hill Interamericana.

- Paul, S.M. (1995). GABA and Glycine. En: F. E. Bloom & Kuper, D. J. (Eds.) *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*. New York : Raven, pp. 87-89.
- Paxinos, G. y Watsonm, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Pennell P. B. (2009) Hormonal aspects of epilepsy. *Neurol Clin.*27(4):1-26.
- Pesold C, Carnucho J, Impagnatiello F, Berg M, Fritschy J, Guidotti A, Costa E. (1997) Tolerance ti Dz and changes in GABA receptor subunit exprression in rat neocortical areas. *Neurosci* 79: 477-487.
- Petursson H, Lander M. (1984) *Dependece tranquiliser*. Maudsley Monograph. Oxford University Press, Oxford 28.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. (2000) GABA (A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult brain rat. *Neuroscience* 101 (4): 815-850.
- Quigg M, Smithson S. D, Fowler K. M. (2009). Laterality and location influence catamenial seizure expression in women with partial epilepsy. *Neurology* 73:223-227.
- Rada P, Hoebel BG. (2005) Acetylcholine in the accumbens is decreased by Dz and increased by benzodiazepine withdrawal: a possible mechanism for dependency. *Eur J Pharmacol* 508 (1-3): 131-138.
- Rapkin AL, Morgan M, Goldman L, Brann DW, Simone D, Mahesh VB. (1997) Progesterone metabolite allopregnanolone in women with premenstrual syndrome. *Obstet Gynecol.* 190: 709-714.

- Reddy D. S. (2009) The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Res.* 85(1):1-30.
- Reddy D. S. Rogawski M. A. (2009) Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurother.* 6(2):392-401.
- Reddy DS, Kim YH, Rogawski MA. (2001) Neurosteroid withdrawal model of premenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsy.* 42: 294-302.
- Reddy DS. (2003a) Pharmacology of endogenous neuroactive steroids. *Crit Rev Neurobiol.* 15: 197-234.
- Reddy DS. (2006) Physiological role of adrenal deoxycorticosterone-derived neuroactive steroids in stress-sensitive conditions. *Neuroscience.* 38: 11-20.
- Reddy DS. (2008) Mass spectrometric quantification and physiological-pharmacological activity of androgenic neurosteroids. *Neurochem Internl.* 52: 541-553.
- Reddy. D. S, Jian K.(2010) The testosterone-derived neurosteroid androstenediol is a positive allosteric modulator of the GABA<sub>A</sub> receptors. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 334: 1031-1041.
- Redolar, D. (2008). *Cerebro y Adicción*. Recuperado de:<http://books.google.com.mx/books?id=WTzLYyEkVj0C&pg=PA33&dq=tolerancia+condicionada&hl=es&sa=X&ei=ih71T9HUIajC2wXTgrDmBg&ved=0CD8Q6wEwAw#v=onepage&q=tolerancia%20condicionada&f=false>
- Ribeiro CS, Soares CA, Franco V, Botega N. (2007). Chronic use of Dz in primary healthcare centers: user profile and usage pattern. *Sao Paulo Med J* 125 (5): 270-274.

- Rupprecht R, Reula J. M. Trapp T. (1993) Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron*. 11:523-530.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. y Tapia, R. (1994). Decrease of Glutamate Descarboxilase Activity after *IN VIVO* Cortical Infusion of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid. *Neurochem*: 24, 363- 368.
- Schacht JP, Randall PK, Waid LR, Baros AM, Latham PK, Wright TM, Myrick H, Anton RF. (2011) Neurocognitive Performance, Alcohol Withdrawal, and Effects of of a Combinations of Flumazenil and Gabapentin in Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 530-554.
- Scharfman. H.E., MacLusky. N.J (2006). The Influence of Gonadal Hormones on Neuronal Excitability, Seizures, and Epilepsy in the Female. *Epilepsia*; 47(9): 1423–1440.
- Shader RI, Greenblatt DJ. (1981) The use of benzodiazepine in clinical practice. *Br. J. clin. Pharmacol* 11, 5S-9S.
- Shen G, Tietz EL. (2011) Down-regulation of synaptic GluN2B subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors: a physiological brake on CA1 neuron  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hyperexcitability during benzodiazepine withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther*. 336 (1): 265-273.
- Shumacher M, Weill-Engerer S, Liere P, Robert F, Franklin RJ, García-Segura LM, Lambert JJ, Mayo W, Melcangi RC, Parducz, Suter U, Carelli C, Baulieu EE, Akwa Y. (2003) Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol*. 71: 3-29.
- Sierra,A., Lavaque, E., Perez-Martin, M., Azcoitia, I., Hales, D. B., and Garcia-Segura, L. M. (2003). Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur. J. Neurosci*. 18, 1458–1467.

- Silva-Barrat C, Velluti J, Szente M, Batini C, Champagnat J. (2005). Exaggeration of Epileptic-Like Patterns by Nicotine Receptor Activation during the GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Res.* 1042(2): 133-143.
- Silva-Barrat, C. Szente, M., Menini, C., Velluti, J. C. y Champagnat, J. A. (2001). Muscarinic Depression of Synaptic Transmission in the Epileptogenic GABA Withdrawal Syndrome Focus. *J Neurophysiol.* 85: 2159-2165
- Silva-Barrat, C. y Champagnat, J. A. (1995). Potassium Current Controls Burst Termination in Rat Neocortical Neurons after GABA Withdrawal. *Neurosci. Lett.* 189(2): 105-108.
- 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.
- Silva-Barrat, Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R. (1989). Relationship between Tolerance to GABA<sub>A</sub> Agonist Bursting Properties in Neocortical Neurons during GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Res* 498: 289-298.
- Smith S. S, Gong Q-H. (2005) Neurosteroids administration and withdrawal alter GABA<sub>A</sub> receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *J Physiol.* 564(2): 421-436.
- Smith S. S, Gulinello M, Orman R. (2003) Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the  $\alpha 4$  subunit of the GABAA receptor in the amygdale after progesterone withdrawal. *Eur J Neurosci.* 17(3): 641-648.
- Smith S. S, Hsu F-C. (2003) Progesterone withdrawal reduces paired-pulse inhibition in rat hippocampus: dependence on GABAA receptor  $\alpha 4$  subunit upregulation. *J Neurophysiol.* 89(1):186-198.

- Smith S. S, Shen H, Gong Q-H. (2005) Short-term steroid treatment increases  $\delta$  GABAA receptor subunit expression in rat CA1 hippocampus: Pharmacological and behavioral effects. *Neuropharmacol.* 49(5): 573-586.
- Smith SS, Gong Q, Li X, Moran M, Bitran D, Frye C, Hsu F. (1998) Withdrawal from  $3\alpha$ -OH- $5\alpha$ -pregnan-20-one using a pseudo pregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 4$  subunit in association with increased anxiety. *J Neuroscience* 18: 5275-5284.
- Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Markowitz RS, French-Mullen JMH, Li X.(1998a) GABA-A receptor  $\alpha 4$ -subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature.* 392: 926-930.
- Smith SS, Shen H, Gong QH, Zhou X. (2007). Neurosteroids regulation of GABA-A receptors: Focus on the alpha 4 and delta subunits. *Pharmacol Ther.* 116: 58-76.
- Squires RF. (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacol* 22: 1443-1450.
- Steppuhn KG, Turski L. (1993) Dz dependence prevented by glutamate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15; 90(14): 6889-6893.
- Sternbach LH (1979). The benzodiazepine story. *J Med Chem* 22 (1): 1-7.
- Sur C, Farrar SJ, Kerby J, Whiting PJ, Atack JR, McKernan RM. (1999) Preferential coassembly of  $\alpha 4$  and  $\delta$  subunits of the GABA<sub>A</sub> receptor in rat thalamus. *Mol Pharmacol.* 56: 110-115.
- Tapia, R. & Sandoval, M. E. (1971). Study of Inhibition of Brain of Glutamate Decarboxylase by Pyridoxal Phosphate Oxime -O-acetic Acid. *Journal of Neurochemistry*, 18: 2051-2059.



- Toki S, Saito T, Hatta S, Takahata N. (1996) Dz and withdrawal in rats is associated with alteration in GABA<sub>A</sub> receptor function. *Life sciences* 59(19): 1631-1641.
- Tsutsui K, Ukena K, Usui M. (1999) Novel brain functions: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neuroscience research*. 36:261-273.
- Turner DM, Ransom RW, Yang JSJ, Olsen EW. (1989) Steroid anesthetics and naturally occurring analogs modulate the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J Pharmacol Exp Ther*. 248: 960-966.
- Uzun S, Kozumplik O, Jakovljevic M, Sedic B. (2010) Sides effects of treatment with benzodiazepines. *Phsychiatr Danub* 22(1): 90-93.
- Vicens C, Fiol F, Lobera J, Campoamor F, Mateu C, Alegret S, Socías I. (2006) Withdrawal from long-term benzodiazepine use: randomized trial in family practice. *British Journal of General Practice* 56: 958-963.
- Vivash L, Tostevin A, Liu DS, Dalic L, Dedeurwaerdere S, Hicks RJ, Williams DA, Myers DE, O'Brien TJ. (2011) Changes in hippocampal GABA<sub>A</sub>/cBZR density during limbic epileptogenesis: relationship to cell loss and mossy fiber sprouting. 41(2): 227-236.
- Ward B. O, Stephens D. N. (1998) Sensitisation of withdrawal signs following repeated withdrawal from benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure sensitivity. *Psychopharmacol*. 135:342-352.
- Ward, B.O., Stephens, D.N. (1998). Sensitisation of withdrawal signs following repeated withdrawal from a benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure activity. *Psychopharmacology*. (135): 342-352.

- Will, B.; Tonilo, G. y Brailowsky, S. (1988). Unilateral Infusion of GABA and Saline into the Nucleus Basalis of Rats: 1. Effects on Motor function and Brain Morphology. *Behavioural Brain Research*. 27: 123- 129.
- Woods JH, Winger G. (1997) Abuse flunitrazepam. *J of clin Psychopharmacol* 17: 1S-57S.
- Xiang K, Tietz EL. (2007) Benzodizepine-induced hippocampal CA1 neuron alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor plasticity linked to severity of withdrawal anxiety: differential role of voltage-gated calcium channels and N-methyl-D-aspartic acid receptors. *Behav Pharmacol* 18 (5-6): 447-460.
- Yu R, Follesa P, Ticku MK. (1996) Downregulation of the GABA receptor subunit mRNA levels in the mammalian cultured cortical neurons following chronic neurosteroid treatment. *Mol Brain Res*. 41: 163-168.
- Zheng P. (2009) Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiol*. 89:134-152.