



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

LA HIPEREXCITABILIDAD NEURONAL DE LA
ABSTINENCIA A GABA PRODUCE MODIFICACIONES
CONDUCTUALES EN LA RATA HEMBRA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGIA

PRESENTA:

ALEJANDRA HERNANDEZ GONZALEZ

DIRECTOR:

DR. EDUARDO CALIXTO GONZALEZ



Facultad
de Psicología



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**El presente trabajo de tesis fue realizado en el
Departamento de Neurobiología de la
Dirección de Investigaciones en Neurociencias
del “Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz”.**



**A su vez, esta tesis contó con el apoyo de la
Comisión coordinadora de Institutos Nacionales
de Salud y Hospitales de Alta Especialidad.**

Beca PROBEI.

MUCHAS GRACIAS POR SU APOYO

A mi familia, lo que más amo en el mundo.

A Karen (mi maestra), por la compañía y los momentos juntas

A Eduardo, por ser mi amigo y por todo lo que me has compartido.

“Con estas sustancias percibimos nuestro ambiente, queremos y odiamos, aprendemos y olvidamos, hablamos y nos movemos. Nuestras realidades están hechas de ellas..., lo mismo que nuestros sueños”.

Simón Brailowsky

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	11
1. SISTEMA INHIBIDOR GABAÉRGICO	11
1.1. <i>Síntesis y metabolismo del GABA</i>	11
1.2. <i>Recaptura del GABA</i>	12
1.3. <i>Fisiología del sistema GABAérgico</i>	13
1.4. <i>El receptor GABA_A</i>	14
1.5. <i>El receptor GABA_B</i>	16
1.6. <i>Modulación del receptor GABA_A por otras sustancias</i>	16
1.7. <i>Distribución del GABA y alteraciones del Sistema GABAérgico</i>	16
2. SÍNDROMES DE ABSTINENCIA RELACIONADOS CON LA NEUROTRANSMISIÓN GABAÉRGICA	17
2.1. <i>Tolerancia y dependencia: Adicción a una sustancia</i>	18
2.2. <i>Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia</i>	20
2.3. <i>El síndrome de abstinencia a GABA (SAG)</i>	21
2.4. <i>Sustancias que modulan al sistema GABAérgico</i>	28
2.5. <i>Hormonas Esteroides</i>	28
2.6. <i>Neuroesteroides</i>	29
3. PAPEL DEL GABA EN LA CONDUCTA	30
3.1. <i>El GABA y la conducta sexual</i>	31
3.2. <i>Participación del GABA en la conducta depresiva y la ansiedad</i>	33
4. JUSTIFICACIÓN	35

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
6. OBJETIVOS	36
7. HIPÓTESIS.....	37
8. MATERIALES Y MÉTODOS	38
8.1. Lista de materiales.....	38
8.2. Cirugías.....	41
8.3. Hormona priming	43
8.4. Instilación intracortical de GABA (Inducción del SAG).....	43
8.5. Instrumentos y equipo de evaluación.....	43
8.6. Diseño experimental	47
8.7. Experimentos.....	47
8.8. Análisis estadístico y EEG	50
9. RESULTADOS	52
9.1. Modificaciones de la excitabilidad neuronal inducidas por el SAG	52
9.2. Análisis del incremento de la frecuencia y la amplitud del EEG durante el SAG.....	54
9.3. Cuantificación de la actividad epileptiforme del SAG a través de los complejos espiga-onda	56
9.4. Efecto de la ovariectomía en la hiperexcitabilidad neuronal inducida por el SAG.....	56
9.5. Correlación del incremento de la potencia asociado al incremento de los complejos espiga-onda durante el SAG.....	66
9.6. Aumento de la conducta sexual en el estadio inicial del SAG.....	67
9.7. Medición de la ansiedad en el estadio inicial del SAG.....	69
9.8. Medición de la conducta depresiva durante el SAG	71
10. DISCUSIÓN.....	74
11. CONCLUSIONES.....	88
12. REFERENCIAS	89

LISTA DE ABREVIATURAS

α - KG	α - cetoglutarato
μ g	microgramos
2-DG	2-desoxiglucosa
3-HSOR	3-hidroxiesteroide oxidoreductasa
5-HT	Serotonina
5 α -R	5 α -reductasa
Ach	Acetilcololina
AloP	Alopregnanolona
Bz	Benzodiazepina
Ca ²⁺	Ión calcio
Cl ⁻	Ión cloro
CS	Conducta sexual
Cx	Corteza
DA	Dopamina
DAVA	Ácido δ - aminovalérico
DHT	5 α -dihidrotrestosterona
Dz	Diazepam
E	Estradiol
EEG	Electroencefalograma
GABA _A	Receptor ionotrópico a GABA
GABA _B	Receptor metabotrópico GABA
GABA-T	GABA <i>transaminasa</i>
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GDX	Gonadectomizados
h	Hora
HHA	Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal
HHG	Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal
Hz	Hertzio (ciclo por segundo)
i.p.	Intraperitoneal

INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”
IPSP	Potencial Postsináptico Inhibitorio
IPSP	Potenciales Postsinápticos Inhibitorios
ISSR	Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina
K ⁺	Ion potasio
LEC	Laberinto elevado en cruz
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
Na ⁺	Ion Sodio
NAc	Núcleo accumbens
NE	Norepinefrina
NF	Nado forzado
OVX	Ovarectomizadas
P	Progesterona
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Fosfato de Piridoxal (vitamina B ₆)
POA	Área Preóptica Medial
Proteínas G	Proteínas asociadas a nucleótidos de guanina
SAG	Síndrome de Abstinencia a GABA
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Succinatosemialdehido
T	Testosterona
THDOC	Tetradihidrodeoxicorticosterona
THIP	Tetrahidroisozalozolo
VMH	Núcleo Ventromedial del Hipotálamo
VTA	Área Tegmental Ventral

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.

El síndrome de abstinencia a GABA (SAG), es un modelo experimental de hiperexcitabilidad neuronal (análoga a las abstinencias generadas por sustancias que modulan al receptor GABA_A), que se origina por la interrupción de la instilación intracortical de GABA en mamíferos.

Una importante premisa para este proyecto es que no conocemos los detalles de los mecanismos electrofisiológicos de génesis y mantenimiento de la abstinencia de diferentes agonistas del receptor GABA_A en la rata hembra. Asimismo, no conocemos el impacto de la abstinencia a GABA en la conducta sexual como tampoco en la ansiedad y depresión. Este es el primer proyecto que estudia estas variables en el cerebro de la rata hembra.

Para conseguir los objetivos planteados se utilizaron 35 ratas hembra ovariectomizadas, a las cuales se les realizó una cirugía estereotáxica para la colocación de cánulas y electrodos de registro electroencefalográfico (EEG), posteriormente se instiló e interrumpió la administración de GABA 5 mM intracortical para provocar hiperexcitabilidad neuronal. Una vez confirmada electroencefalográficamente la abstinencia, se procedió a la medición de tres paradigmas de evaluación conductual en el mismo animal: 1) el Laberinto elevado en cruz, para evaluar el estado de ansiedad; 2) el Nado forzado, para cuantificar el estado depresivo y 3) evaluación de la conducta sexual con el fin de identificar el efecto del SAG en el proceso de lordosis.

La hiperexcitabilidad neuronal característica del SAG, se identificó como una actividad espiga-onda originada en el sitio de instilación intracortical (1740 ± 260 espigas/ 30 min; $p \leq 0.001$), la cual se propaga al hemisferio

contralateral. Éste proceso de hiperexcitabilidad neuronal tiene una latencia corta (15 min) y duración larga (5 días). Esta actividad incrementa significativamente la potencia del EEG (133%). En los estadios iniciales del SAG los animales tienen una conducta de ansiedad (99% de permanencia en brazos cerrados). Se manifiesta un perfil depresivo (incremento de la inmovilidad de 62%) y finalmente se asocia con un incremento en la actividad sexual (el cociente de lordosis aumento un 35%). Estos resultados sugieren que el SAG en la rata hembra incrementa la actividad del EEG y se asocia al incremento en la conducta sexual y en conductas asociadas a la ansiedad y la depresión.

INTRODUCCIÓN

La neurotransmisión GABAérgica representa el principal control inhibitorio en el cerebro: el 70% de la actividad inhibitoria cerebral está mediada por dicha neurotransmisión. El GABA modula significativamente 3 conductas distintas: la conducta sexual, la ansiedad y la depresión (Frye, 2001; Möhler, 2012; Paredes, 1991). El mecanismo farmacológico de esta modulación es una activación directa del receptor GABA_A. Diversas evidencias en el campo de las neurociencias muestran que la conducta sexual en la rata hembra es debida a la activación en serie de núcleos subcorticales: el núcleo ventromedial del hipotálamo, el área pre-óptica medial y el área tegmental ventral. Estas estructuras modifican su actividad debido a efectos no genómicos de la neurotransmisión GABAérgica: en mamíferos, antagonistas del receptor GABA_A disminuyen la conducta sexual. En este contexto, agonistas GABAérgicos tienen efectos ansiolíticos. Asimismo, la reducción intracortical de los niveles de este neurotransmisor y modificaciones en la conformación de los receptores GABA_A y GABA_B son responsables de la conducta depresiva. Por otra parte, la interrupción abrupta de la administración intracortical de GABA, incrementa la excitabilidad neuronal generando la aparición de actividad epileptiforme, como ya se mencionó, este fenómeno es conocido como SAG. El SAG es una analogía heurística con abstinencias generadas por otros moduladores del receptor GABA_A.

El planteamiento del problema de este protocolo se basa en que debido a que el SAG se debe a una reducción de la inhibición por GABA en el cerebro no conocemos las implicaciones que pueda tener este modelo en la génesis y el mantenimiento de la conducta sexual, la ansiedad y la depresión en la rata hembra. La hipótesis de este trabajo propone que el SAG en su estado inicial incrementa el nivel de ansiedad, la conducta sexual y la conducta depresiva.

Este es el primer trabajo que analiza los cambios del EEG asociados a las modificaciones conductuales durante el SAG de la rata hembra.

I ANTECEDENTES

1. Sistema inhibitor GABAérgico

Algunos aminoácidos cumplen con los criterios de los neurotransmisores los cuales siguen los mismos principios que las catecolaminas. Sin embargo, una diferencia entre estos es que los primeros son derivados del metabolismo de la glucosa. Entre los aminoácidos que fungen como neurotransmisores en el cerebro, se encuentra el ácido γ -aminobutírico mejor conocido como GABA que es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos, siendo este último, el órgano donde es sintetizado en mayor cantidad (Zigmond 1999; Olsen, 1990; Murray, Mayes, Granner y Rodwell, 2001; Cortés-Romero, Galindo, Galicia-Ismendi y Flores, 2011).

Estudios realizados por el grupo de Krnjeviè y Schwartz en 1967, establecieron al GABA como el neurotransmisor que tiene la característica de inducir inhibición en las neuronas de los mamíferos para disparar potenciales de acción. Aunque inicialmente el GABA era ubicado en circuitos locales, actualmente sabemos que existen proyecciones y vías GABAérgicas hacia regiones distantes en el cerebro (Zigmond 1999; Purves et al, 2006).

1.1 Síntesis y metabolismo del GABA

El precursor predominante de la síntesis de GABA es la glucosa, la cual se sintetiza en ácido glutámico o glutamato, el cual paradójicamente tiene un efecto excitador sobre las neuronas. La enzima encargada de convertir el glutamato a GABA es la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la cual es casi exclusiva de las neuronas GABAérgicas; para que la enzima tenga efecto, requiere un cofactor, el fosfato de piridoxal derivado de la vitamina B6 (Purves et al., 2006; figura1).

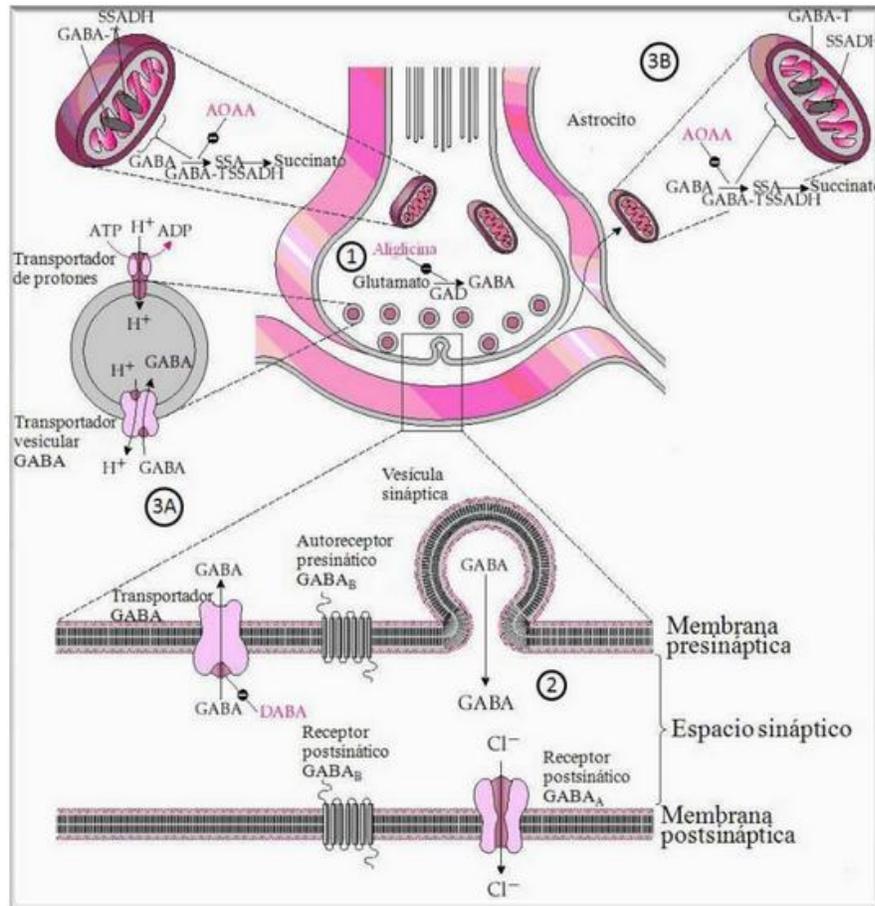


Figura 1. Síntesis, liberación, recaptura y metabolismo del GABA. 1) Síntesis: El GABA es sintetizado en el citosol a partir del glutamato por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). **2)** Liberación: El GABA puede liberarse al espacio sináptico a través de almacenes vesiculares, una vez fuera de la terminal puede acoplarse a receptores metabotrópicos (GABA_B) tanto presinápticos como posinápticos y a receptores ionotrópicos (GABA_A y GABA_C) posinápticos. **3A)** Recaptura: La recaptura del GABA se da por medio de autorreceptores presinápticos (GABA_B) o por el transportador GABA (GAT 1-4) el cual puede ser glial o neuronal. **3B)** Por último, el GABA es catabolizado por medio de la enzima GABA transaminasa (GABA-T) en succinosemialdehído (SSA; 3B). Tomado y modificado de Miguel, Alejandro 2012.

1.2 Recaptura del GABA

Como en el caso de otros neurotransmisores, el GABA cuenta con un sistema de recaptura, el cual tiene como función remover el neurotransmisor del espacio sináptico como parte del proceso de la sinapsis, en este proceso están involucradas las células gliales, las neuronas, y depende del gradiente

electroquímico del Na^+ , lo que involucra directamente la activación de la actividad de la $\text{ATPaseNa}^+/\text{K}^+$ (Olsen, 2000).

El transportador de GABA es una proteína de doce pasos transmembranales y 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. Esta proteína expresa sitios para ser fosforilada: uno para proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) y siete para proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), es decir, el proceso de recaptura es modulado por la activación de segundos mensajeros (Bowery, 1990; Nelson, Mandiyan y Nelson, 1990; ver figura 1).

1.3 Fisiología del sistema GABAérgico

El GABA puede ejercer sus efectos en ambas membranas de la sinapsis. El efecto a nivel presináptico, está mediado por la disminución del ingreso de calcio (Ca^{2+}) al botón terminal, que a su vez, deriva en la disminución de la liberación del neurotransmisor.

En la postsinapsis, el mecanismo principal se debe a un aumento en la conductancia del ion cloro (Cl^-) que genera una hiperpolarización en la membrana postsináptica, lo que aleja a la célula de la posibilidad de generar potenciales de acción. Aunado a esto, en ciertas neuronas puede existir un aumento en la conductancia de potasio (K^+) lo que favorece aún más el efecto de hiperpolarización (Purves, 2007). Este evento es conocido como potencial posináptico inhibitorio (IPSP) los cuales pueden ser rápidos (menos de 100 milisegundos) o lentos (más de 100 milisegundos).

Los efectos del GABA a nivel pre y post- sináptico, son consecuencia de su interacción con proteínas receptoras. Los receptores a GABA, están divididos en dos grandes grupos, uno asociado a proteínas G y nucleótidos cíclicos,

denominado GABA_B el cual es de tipo metabotrópico. El otro llamado GABA_A es de tipo ionotrópico, que es de gran interés en esta tesis, por lo tanto, se abundará en su descripción, un subtipo del receptor GABA_A es el denominado GABA_C, el cual está localizado principalmente en la retina.

1.4 El receptor GABA_A

El receptor GABA_A es un receptor ionotrópico, está compuesto por 5 subunidades distintas que, al ensamblarse forman un canal que permite el paso de iones de Cl⁻ o HCO₃⁻, este canal es activado debido a los cambios conformacionales de la proteína, tras la acción del neurotransmisor (ver figura 2).

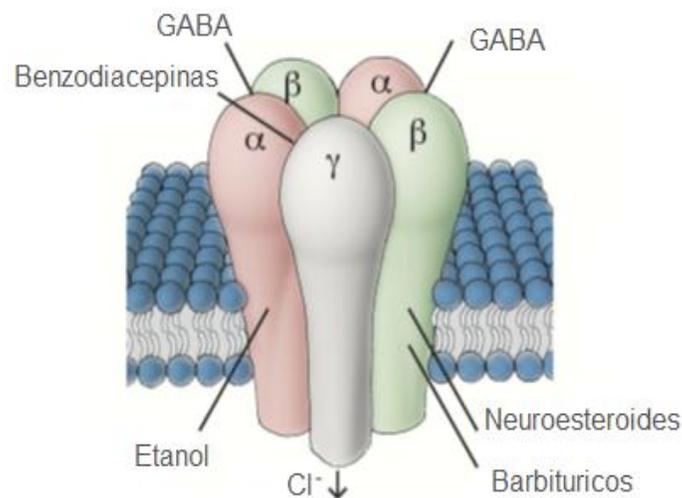


Figura 2. Esquema del receptor GABA_A y los sitios de unión. El receptor GABA_A es un heteropentámero que en su forma más común contiene dos subunidades α, dos subunidades β y una subunidad γ; contienen sitios de unión para varias moléculas, como las benzodiazepinas, el etanol, los neuroesteroides, los barbitúricos y el GABA cuyo sitio de unión está entre las subunidades α y β. Imagen tomada y modificada de Uusi-Oukari y Korpi, 2010.

El receptor, puede formarse por la interacción de cualquiera de las 16 subunidades: α1-6, β1-3, γ1-3, δ, ε, π, θ; ρ1-3 (Cortés- Romero et al., 2011; Parker, 2006; Olsen, 2000). La mayoría de los receptores GABA_A están compuestos por las subunidades αβγ (en estequiometría 2:2:1 respectivamente),

aunque la isoforma más abundante es la $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. La forma en que estas subunidades se expresan y se combinan puede variar la sensibilidad farmacológica, asimismo, las isoformas que se expresan dependen de la zona del cerebro (ver tabla 1). El sitio de pegado del GABA se encuentra específicamente entre las subunidades α y β .

Tabla1 Ubicación de isoformas y distribución del receptor GABA_A	
Isoformas GABA_A	Distribución en el SNC
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Capa granular del bulbo olfatorio, capa de células polimorfas y región CA3 del hipocampo, interneuronas corticales, globo pálido y varios núcleos subtalámicos.
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	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_A. En la columna de la izquierda se presentan las subunidades que componen las diferentes isoformas del receptor GABA_A y en la columna de la derecha se expone su distribución en SNC. Tomada y modificado de Miguel, Alejandro 2012.

1.5 El receptor GABA_B

Se clasifica como receptor metabotrópico porque tiene una acción lenta y prolongada dependiente de la activación de segundos mensajeros. Aunque predomina en la membrana presináptica, donde actúa como autorreceptor inhibiendo la liberación de GABA debido al bloqueo del ingreso de Ca²⁺ a la célula, también se puede encontrar en la membrana postsináptica, donde puede ejercer un efecto sobre la activación de los canales de K⁺ y Ca²⁺. Los receptores GABA_B se componen de la subunidad GABA_{B1} y GABA_{B2}. El agonista selectivo de este receptor es el baclofén (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988).

1.6 Modulación del receptor GABA_A por otras sustancias

Las benzodiazepinas, como el Diazepam (Dz), son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, lo que significa que se unen al receptor en un sitio distinto al del GABA y ejercen su acción facilitando la transmisión GABAérgica inhibitoria en la subunidad α del receptor GABA_A, produce la apertura del canal permitiendo una corriente entrante de Cl⁻. 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.

La picrotoxina es considerada un proconvulsivo y actúa bloqueando el ionóforo de Cl⁻. Otros moduladores como el pentilenetetrazol y la penicilina son convulsivantes debido a que bloquean la actividad GABAérgica. El etanol es una sustancia capaz de regular la actividad del receptor GABA_A con sitios de unión en las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 4$ (Sandeep et al., 2009). Sustancias endógenas, como los neuroesteroides pueden modular directamente al sistema GABAérgico.

1.7 Distribución del GABA y alteraciones del sistema GABAérgico

Dada la gran importancia de la modulación GABAérgica en el control de la excitabilidad neuronal, es válido pensar que una alteración de este sistema es el sustrato fisiológico para el desarrollo de diversas alteraciones en el estado de ánimo.

Los desórdenes psiquiátricos están asociados a un desequilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal, 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 y Kemp 2006); el sistema GABAérgico es el objetivo de un amplio rango de drogas en el SNC, incluidos los ansiolíticos, sedativos-hipnóticos, anestésicos y anticonvulsivantes (Olsen, 2000).

Se ha asociado la pérdida del tono GABAérgico en la génesis de 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 en la corteza. Asimismo, el número de terminales axónicas y en consecuencia la densidad procesos de transporte del GABA se ven disminuidos en modelos animales con focos epilépticos (Krogsgaard- Larsen, Falch, Larsson y Schousboe, 1987).

2. Síndromes de abstinencia relacionados con la neurotransmisión GABAérgica

Durante el curso de la historia, la humanidad ha consumido distintas sustancias que modifican la conducta, ya sea el estado de ánimo, la percepción, o la cognición. Ejemplos de estas sustancias son el alcohol, la cafeína, la marihuana entre otras. De igual manera los avances en el estudio de la psicofarmacología, han traído consigo numerosos fármacos que tienen efectos a nivel conductual, tal es el caso de los psicotrópicos.

Estas sustancias tienen la capacidad de modificar la conducta de aquel que las consume, generando estados de tolerancia y dependencia que lo vuelven completamente dependiente de la misma (Brailowsky et al., 2000).

2.1 Tolerancia y dependencia: Adicción a una sustancia.

La adicción a drogas es una enfermedad recurrente, con consecuencias, médicas y sociales evidentes. Una adicción es definida como la necesidad de un fármaco o droga para que un organismo pueda funcionar de manera óptima, es decir, el individuo persiste en el consumo de la sustancia a pesar de las consecuencias adversas (Purves 2007). Existen dos mecanismos cruciales en la génesis de la adicción: la tolerancia y la dependencia.

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, farmacodinámica aguda y 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 de los barbitúricos, ya que estimulan la producción de enzimas microsomales en el hepatocito, con el consecuente retiro y catabolismo rápido de los barbitúricos de la circulación (McLellan et al., 1992).

La tolerancia farmacodinámica, funcional o de tipo celular, da como resultado la expresión del cambio en el número de receptores (up/down regulation) asociado o no a cambios en la afinidad del receptor por la droga (fosforilación-

desfosforilación). También puede deberse a un desacoplamiento de las cadenas de señalización con el receptor como fosforilación, desfosforilación, cambios en el genoma y 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 y a lo largo de la misma sesión (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 de 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 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 que la droga produce (O'Brien, 1996).

La tolerancia, la dependencia física y el 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.

2.2 Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia

Las modificaciones en la conformación del receptor GABA_A puede ser el origen de las alteraciones en los fenómenos que caracterizan la abstinencia a sustancias depresoras del cerebro, así como en algunos tipos de abstinencias o trastornos conductuales. La expresión del ARNm de las subunidades del receptor cambia debido a la excitabilidad neuronal, ya que después de crisis epilépticas disminuye la expresión de algunas subunidades como $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 4$ y $\gamma 1$ en las regiones donde se encuentra el foco epiléptico, este proceso modifica la sensibilidad del receptor al GABA y a otros agonistas (Smith, 2007).

Trabajos previos (Uusi-Oukari, 2010) señalan que los cambios en la expresión de las subunidades $\alpha 4$ son fundamentales en la génesis de algunos tipos de epilepsia y en el inicio de las abstinencias a benzodiazepinas y neuroesteroides.

2.3 El Síndrome de abstinencia a GABA (SAG)

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

En estos monos, la estimulación luminosa intermitente inducía la aparición de descargas epilépticas al nivel de la corteza cerebral, acompañadas de mioclonias 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, Menini, Silva-Barrat y Naquel, 1987; Brailowsky, 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 al 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 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 et al., 1987; Brailowsky 1988; 1989; Will, Toniolo, y Brailowsky, 1988; Fukuda et al., 1987; Montiel et al., 2000).

A este fenómeno de hiperexcitabilidad se le llamó “Síndrome de Abstinencia al GABA” (SAG; LeGal La Salle et al., 1988; Silva-Barrat et al., 1992), 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 benzodiacepinas (Diazepam; Dz) y a barbitúricos (pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modifica la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica en las primeras 24 h (Brailowsky et al., 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 en 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).

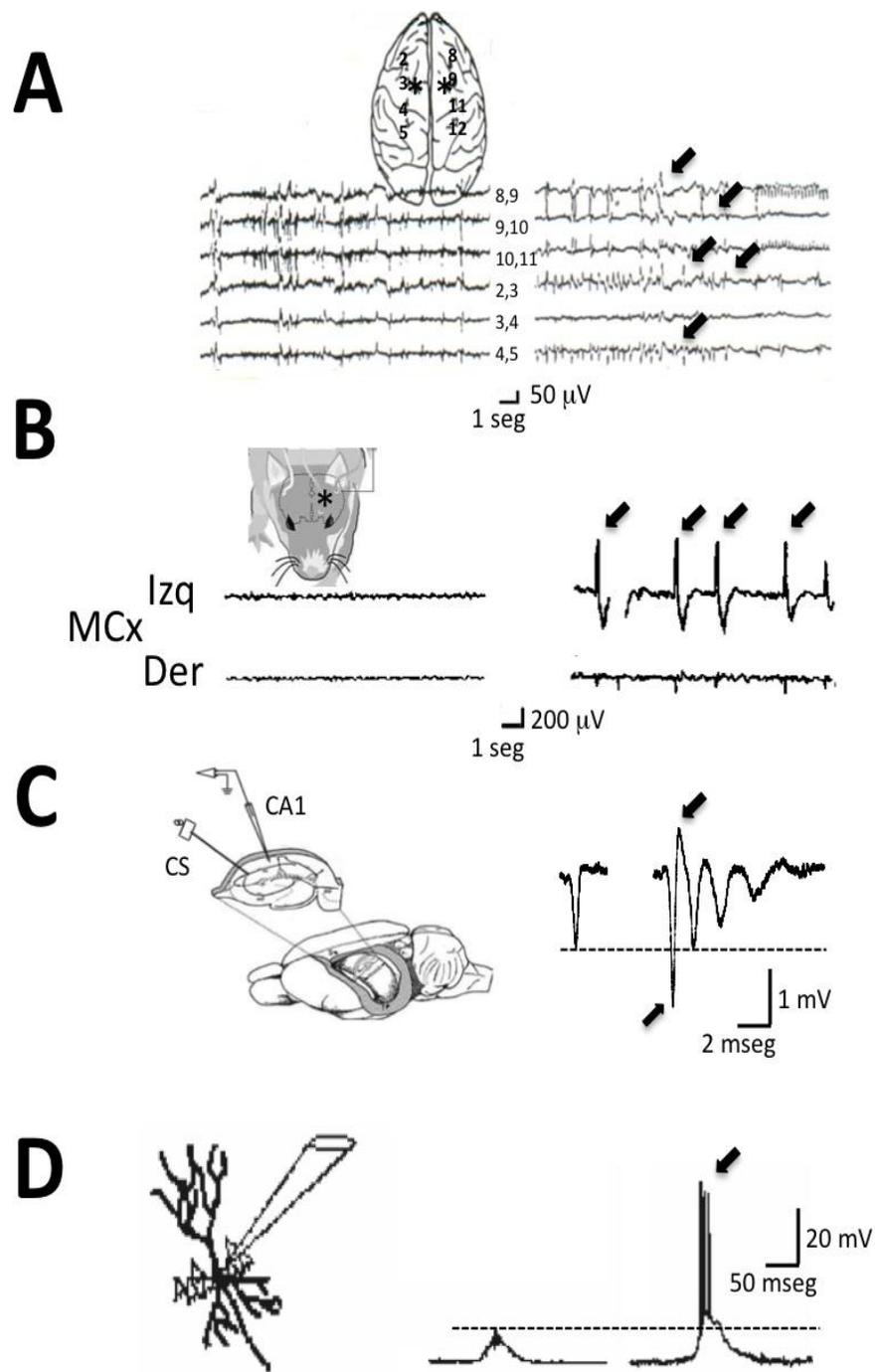


Figura 3. La abstinencia a GABA puede estudiarse en 4 diferentes preparaciones electrofisiológicas **A** (EEG), **B** (Electrocorticograma), **C** (Potencial sináptico de campo) y **D** (Registro de célula única). En todos los ejemplos se identifica el incremento de la excitabilidad neuronal. Tomado de Calixto, 2012.

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

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, carbamazepinas) e incluso el fármaco de elección es casos de status 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., 1998; 1990; 1991).

En estudios orientados a reproducir *in vitro* este fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal, se realizaron experimentos en rebanadas de hipocampo de rata. 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, 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 (García-Ugalde et al., 1992; Casasola, Montiel, Calixto y Brailowsky, 2004).

En resumen, desde el punto de vista clínico, durante el SAG ocurren varios cuadros observados en el humano:

1. Un cuadro de estado epiléptico focal (actividad paroxística continua localizada en una zona específica).
2. Un síndrome de epilepsia parcial continua (síndrome de Kojewnikow), caracterizado por descargas focales asociadas a mioclonus y a descargas epileptiformes lateralizadas periódicas.
3. Desde el punto de vista fisiopatológico, el SAG se encuentra relacionado con todos aquellos síndromes caracterizados por alteraciones de la neurotransmisión inhibitoria y se asemeja a otros modelos de epileptogénesis inducida por bloqueadores del GABA, como la bicuculina o la picrotoxina. Ambos modelos se acompañan de hiperexcitabilidad neuronal, de hipermetabolismo glucídico y de cambios neuropatológicos compatibles con excitotoxicidad.
4. Desde el punto de vista neurofarmacológico, el SAG constituye un fenómeno dependiente de receptores GABA_A, que se acompaña de disminución en la actividad de la síntesis de la GAD y de tolerancia a agonistas específicos de este receptor (isoguvacina). Por otra parte, la reactividad farmacológica del SAG varía con el tiempo de evolución: extremadamente resistente en las primeras 24 horas y sensible a benzodiazepinas después.
5. El SAG puede relacionarse a síndromes de abstinencia semejantes a los que se observan después de suspender bruscamente la

administración prolongada de sustancias, que se caracterizan por facilitar la transmisión GABAérgica.

6. El animal con SAG presenta dependencia al GABA y muestra alteraciones conductuales como hipersomnia, irritabilidad y aumento de la actividad exploratoria, además de movimientos mioclónicos de la pata trasera contralateral al hemisferio infundido y, ocasionalmente, sacudidas “mioclónicas”.

7. La hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia al GABA puede estudiarse en cuatro abordajes electrofisiológicos distintos. **(7.1)** En el EEG, la aparición de actividad anormal espontánea que se aprecia (flechas negras, figura 3A) se observa con mayor amplitud cerca de las zonas de infusión (asteriscos en ambas regiones parietales, canales 3 y 9). Este incremento de actividad posterior a la interrupción de la infusión de GABA coexiste con la epilepsia fotosensible previa que tienen estos mamíferos. **(7.2)** El modelo de abstinencia a GABA observado en el EEG es reproducible en ratas. Ambas cortezas motoras se registran en condiciones control (registros del panel izquierdo) 90 min., después del retiro abrupto de la instilación de GABA en la corteza izquierda (Izq) aparecen complejos espigonda de alta frecuencia y amplitud los cuales son exclusivos de la zona que recibió GABA, en contraste con la corteza derecha (Der; figura 3B). **(7.3)** La abstinencia a GABA *in vivo* tiene un correlato *in vitro*. En rebanadas de cerebro en las cuales se registró la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo por estimulación de los axones de las neuronas provenientes del área CA3 (Colaterales de *Shaffer*) se obtienen registros de potenciales sinápticos excitatorios de campo (*fEPSP*, por sus siglas en inglés), en condiciones control, la respuesta sináptica mantiene su amplitud (línea discontinua), sin embargo, 2h después de eliminar el GABA del medio de perfusión, se induce un incremento significativo de la amplitud de la espiga sináptica (flecha negra figura 3C), esto es, que durante la abstinencia hay un incremento en la sincronía de disparos de potenciales de acción de las poblaciones neuronales registradas en la rebanada. **(7.4)** El registro

intracelular de una neurona en condiciones control (izquierda) y en abstinencia a GABA (derecha), muestra que las neuronas en condiciones de hiperexcitabilidad por la abstinencia, manifiestan una disminución en el umbral de disparo y la aparición de disparos de potenciales de acción en forma de ráfagas (marcado por la flecha, figura 3D).

8. Los mecanismos sinápticos que explican el incremento de la actividad neuronal de la abstinencia a GABA propuestos son: modificaciones en los elementos pre- y postsinápticos: en la presinapsis se elabora, almacena y se libera el GABA. En la postsinapsis, el receptor GABA_A sináptico y extrasináptico modulan la inhibición. La instilación de GABA incrementa significativamente al aminoácido en el espacio sináptico, lo cual incide directamente sobre ambos componentes sinápticos. En el componente presináptico, la síntesis de GABA se reduce por una disminución de la actividad y de la expresión de la enzima GAD, el neurotransmisor empaquetado, disminuye su liberación, en consecuencia, la concentración de GABA en el espacio sináptico disminuye. En el componente postsináptico, los cambios inmediatos son una reducción en la densidad de receptores y en forma gradual, nuevos receptores GABA_A tienen una disminución en su sensibilidad farmacológica debido a cambios en su composición por expresión de nuevas subunidades. Finalmente, el proceso de incremento en la excitabilidad se ve favorecido por un aumento en la conductancia de Ca²⁺, el cual, predispone a un más las propiedades excitables de las neuronas.

La expresión de subunidades que componen al receptor GABA_A durante la abstinencia a GABA en neuronas piramidales de corteza cerebral, indican una disminución de la expresión de la subunidad α 1 del receptor (como lo hacen la progesterona (P), la alopregnanolona y el alcohol) y la subunidad α 2 contrario a lo que induce la abstinencia a alcohol (Calixto, 2012).

2.4 Sustancias que modulan al sistema GABAérgico

Además del propio neurotransmisor, existen diversas sustancias que pueden modificar directamente a la neurotransmisión GABAérgica, debido a que actúan directamente sobre los receptores a GABA, teniendo un efecto agonista o bien, como moduladores alostéricos del mismo, ejemplo de ello son las hormonas esteroides sexuales las cuales modulan directamente al receptor GABA_A.

2.5 Hormonas esteroides sexuales

Las hormonas esteroides sexuales, andrógenos, progestágenos y estrógenos, son derivados de un mismo precursor común, el colesterol. Tanto hombres como mujeres sintetizan esas hormonas, pero en distintas concentraciones. Ambos sexos también tienen receptores para estas sustancias; aunque, hay regiones con diferencia en la densidad de los receptores según el sexo (Falnagan- Cato, 2011; Purves et al., 2006; Pisu y Serra, 2004). Dado que los esteroides sexuales, son permeables para la célula, tienen efectos intracelulares modificando la expresión genética. Las neuronas tienen la capacidad de seleccionar y concentrar esteroides específicos por medio de receptores y proteínas fijadoras tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Un “esteroide neuroactivo”, es un esteroide sintetizado fuera del cerebro, capaz de modificar la actividad neuronal, incluyendo todos esteroides naturales y sintéticos que pudieran modificar la excitabilidad de las neuronas mediante su unión al receptor de la membrana de la misma manera en que actúan los neurotransmisores (Martín-García, Darbra y Pallarès, 2007; Pisu y Serra, 2004).

Un ejemplo de esteroides neuroactivos son las progestinas, las cuales son secretadas por los ovarios y las glándulas suprarrenales, éstas son metabolizadas por la glía por acciones de las enzimas 5 α -reductasa (5 α -R) y 3-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3-HSOR). Sin embargo, los metabolitos periféricos se dividen rápidamente en el hígado; la P puede tener efectos en el cerebro por su rápida

conversión a alopregnanolona (3 α , 5 α -TH PROG; AloP) o por una mayor formación de 3 α , 5 α -TH PROG por las células gliales (Martín-García et al., 2007).

2.6 Neuroesteroides

Los neuroesteroides son una subclase de esteroides que pueden sintetizarse *de novo* en el SNC a partir del colesterol, las principales células esteroideogénicas son las neuronas y las células gliales (oligodendrocitos y astrocitos; Martín-García et al., 2007).

La biosíntesis de todos los neuroesteroides comienza con la conversión enzimática del colesterol a pregnenolona (figura 4). La etapa limitante es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentra el complejo enzimático, el citocromoP450.

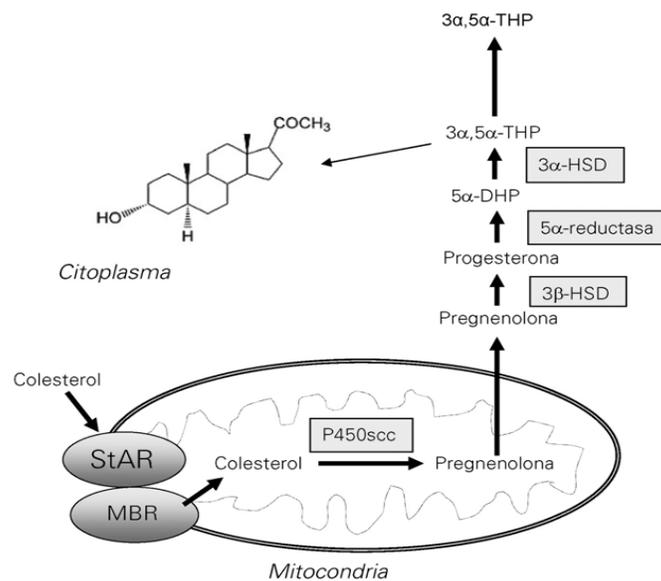


Figura 4. Biosíntesis de los neuroesteroides moduladores del receptor GABA_A. Se muestra la ruta de síntesis de Alop (3 α , 5 α -HTP) desde el colesterol. La proteína de regulación aguda de la esteroideogénesis (StAR) podría interactuar con el receptor periférico a benzodiazepinas para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial. P450 cc: citocromo P450, 3 α , 5 α -HSD: 3 α o 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa; 5 α - DHP: 5 α - dihidroprogesterona. Tomado de Martín-García et al., 2007.

El transporte de colesterol en la membrana mitocondrial es mediado principalmente por dos enzimas: la proteína de la regulación aguda de la esteroideogénesis (StAR, por sus siglas en inglés) y el receptor mitocondrial de benzodiazepinas, las cuales pueden actuar sinérgicamente para incrementar la producción de neuroesteroides (Martín- García, 2007; Schumacher et al., 2003).

Esta síntesis de *novo* de pregnenolona (precursor de todos los neuroesteroides; figura 4) en el cerebro ocurre independiente de la secreción de las glándulas periféricas y en respuesta a los estímulos reproductivos relevantes, por ejemplo, la conducta sexual que permite un rápido aumento de AloP en el cerebro medio en ratas intactas receptoras, ovariectomizadas (OVX) y adrenalectomizadas con la sensibilización (*E-priming*; Martín-García, 2007).

La principal acción de los neuroesteroides en el cerebro es a través de la acción en los receptores ionotrópicos, siendo la modulación alostérica positiva de los receptores GABA_A la más estudiada (Majewska, Harrison, Schwartz, Barker, y Paul, 1986; Smith, Shen, Gong, y Zhou; 2007).

La pregnenolona es el neuroesteroide más abundante en el cerebro humano, cuantificado en regiones como: el hipocampo, la amígdala, la corteza frontal, el estriado, el hipotálamo y el cerebelo.

Los neuroesteroides y los esteroides neuroactivos son de mucha importancia en esta tesis, ya que modulan la actividad GABAérgica y tienen una participación fundamental en la expresión y mantenimiento de la conducta sexual de la rata hembra.

3. *Papel del GABA en la conducta*

Dada la amplia distribución de este neurotransmisor en el SNC, el sistema GABAérgico fue ignorado durante mucho tiempo como un modulador importante del patrón conductual de los mamíferos (Paredes y Anders, 1991). Sin embargo tras una amplia labor científica, se ha llegado a la conclusión de que este

neurotransmisor puede estar involucrado tanto en conductas que conllevan una alta actividad cognoscitiva como en aquellas que parecen tener un origen más primitivo. Es por eso, que en esta tesis, se abordan tres de las conductas que son moduladas directamente por esta neurotransmisión, la conducta sexual, la ansiedad y la depresión.

3.1 *El GABA y la conducta sexual*

La conducta sexual femenina tiene componentes que son fácilmente estudiados y cuantificados, como los componentes motivacionales dependientes de la regulación hormonal y los aspectos sensoriales y motores además de la influencia ambiental que se puede ejercer sobre ella. La conducta sexual tiene tres tipos básicos de comportamiento: a) proceptividad, b) receptividad y c) atractividad (Bonilla, 2005). El reflejo de lordosis es el principal indicador de receptividad en las ratas, consiste en una respuesta postural refleja de la hembra al contacto sexual, consta del retraimiento de la cola, el arqueado de la espalda y el levantamiento de la grupa exponiendo la zona genital, postura que las hembras adoptan cuando son montadas por un macho. La lordosis es la respuesta a la monta de un macho sexualmente vigoroso y es evaluado como un índice de receptividad o comportamiento copulatorio (Lucio y Tlachi-López, 2008; figura 5), la atractividad incluye todos aquellos elementos o características de la hembra que resultan atractivas al macho.

El ciclo estral de la rata dura cuatro días, comprende 4 etapas: 1) metaestro, 2) diestro, 3) proestro y 4) estro. Durante estas etapas, la concentración de hormonas esteroides (E y P) que producen sus ovarios fluctúa, pero la concentración máxima de ambas, ocurre durante el proestro, poco antes de la ovulación. Entonces una rata inicia la fase estro desde la noche del día de la fase proestro, cuando el pico máximo de ambas hormonas ováricas está presente la hembra se encuentra en condiciones de estro natural. Una hembra receptiva o en fase de estro es aquella que muestra conductas proceptivas y receptivas (Falnagan- Cato, 2011; Lucio y Tlachi-López, 2008; González y Hernández, 2002).

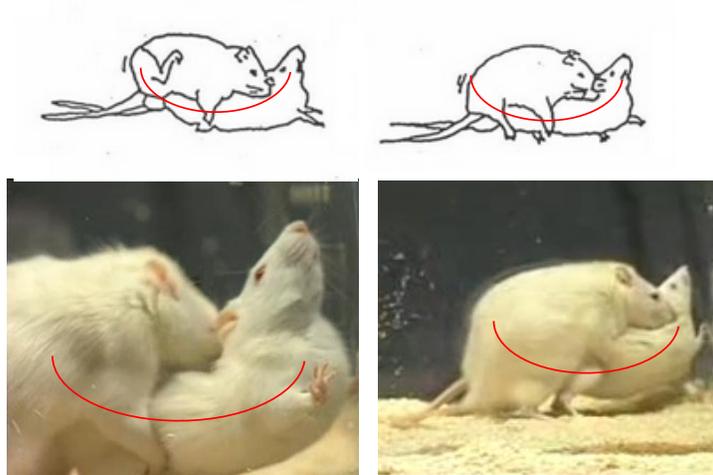


Figura 5. Conducta sexual de la rata hembra. Se muestra el patrón copulatorio de una rata hembra en fase de estro en presencia de un macho sexualmente experto, el cual palpa los flancos generando el reflejo de lordosis (elevación de la grupa y arqueado de la espalda). Modificado de Pimentel, Ana Karen 2013.

El estro puede ser inducido en hembras Ovx, mediante la aplicación de hormonas sintéticas, se administra una dosis de estradiol (E) 48 h y progesterona (P) 4 h previas al inicio de la prueba; en estas condiciones, ambos patrones conductuales se presentarán: receptividad/ proceptividad, el evento tienen una duración de 8 h aproximadamente (Falnagan- Cato, 2011).

Las estructuras que se encuentran principalmente involucradas son el área tegmental ventral (VTA) el núcleo ventro-medial del hipotálamo (VMH) y el área preóptica medial.

La regulación de la conducta sexual femenina, se debe a dos mecanismos distintos, el primero de ellos es la vía genómica, es decir, los mecanismos se dan a través de receptores intracelulares a las hormonas sexuales, este tipo de efectos se centran principalmente el VMH; sin embargo, además de estos receptores las hormonas pueden regular la conducta sexual femenina mediante la vía no genómica, en la que se consideran los efectos de las hormonas en la

neurotransmisión GABAérgica, mediante el receptor GABA_A, estos efectos, se presentan con mayor frecuencia en el VTA (Fye, 2001).

3.2 Participación del GABA en la conducta depresiva y de ansiedad.

La ansiedad y la depresión son consideradas como las consecuencias más comunes del estrés constante en humanos y animales, son dos de las patologías psiquiátricas con mayor prevalencia a nivel mundial. Anteriormente se consideró que los mecanismos fisiológicos involucrados en estos procesos eran independientes, sin embargo, se ha elucidado tras diversas investigaciones, que ambos estados pueden tener un mecanismo en común: el GABAérgico (Croakin, Levinson y Daskalakis, 2011; Möhler, 2012; Paredes, 1991).

Es conocida la participación del sistema GABAérgico en la génesis de la ansiedad, la disminución en las concentraciones de GABA induce un estado de ansiedad en los mamíferos, por lo tanto, los fármacos que modulan este sistema, principalmente las benzodiazepinas, son de primera elección para el tratamiento de esta patología (Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

En años recientes se ha retomado la hipótesis de la participación de las interneuronas GABAérgicas en conductas patológicas en respuesta al estrés crónico en animales y humanos: la ansiedad y la depresión, causadas por cambios en el ambiente. La primera, se compone de los mecanismos de miedo, los cuales dan aviso de la situación peligrosa, para evitar o enfrentar a la amenaza (Möhler, 2012).

La depresión es un desorden complejo y heterogéneo con un amplio espectro de anomalías entre los que se incluyen cambios en el estado de ánimo, anhedonia, abulia alteración en el sueño, fatiga, pérdida de la autoestima, pensamientos negativos y suicidas (Möhler, 2012). La ansiedad y la depresión tienen una amplia comorbilidad, además de que comúnmente responden a los mismos tratamientos lo cual supone una disfunción neurobiológica en común. Se ha considerado que ambas conductas se superponen y pueden ocurrir juntas, o que la primera antecede a la otra, así que se propone que los síntomas podrían

responder al mismo tratamiento farmacológico y los mecanismos neuroquímicos que las subyacen podrían ser similares.

Una alteración en la regulación del sistema GABAérgico parece ser un determinante común para ambos desordenes. Aunado a esto ambos trastornos tienen como consecuencia una alteración en la actividad cognitiva, incrementando la reactividad a los estímulos amenazantes por lo que un estímulo ambiguo puede parecer aversivo (Möhler, 2012).

La participación del GABA en los mecanismos fisiológicos de la depresión fue propuesta desde los años ochenta debido a observaciones clínicas, en donde se notó que el valproato, ejercía efectos sobre el trastorno bipolar, modificando así, la tendencia a las explicaciones que involucran al sistema monoaminérgico como único sistema involucrado en la fisiopatología de estos trastornos (Petty, Kramer y Rush, 1982).

4. JUSTIFICACIÓN

El uso y abuso de drogas es un problema que ha ido creciendo exponencialmente. Desde su reporte de 1998, Medina Mora, mostraba la tendencia a un rápido incremento del abuso de sustancias, siendo los jóvenes una de las poblaciones de mayor riesgo. Para el último reporte de la *Encuesta Nacional de Adicciones* en el año 2008, los trastornos del uso de sustancias en nuestro país son comunes, cercanos al 10 % del total de la población, siendo los más frecuentes el abuso del alcohol y las benzodiazepinas. Es alarmante que la prevalencia del uso de estas sustancias en la región centro sur este del país es del 36%. Estas estadísticas epidemiológicas señalan a las abstinencias por psicotrópicos GABAérgicos como un potencial problema de salud.

Es claro que el abuso de estas sustancias induce estados de tolerancia y dependencia, lo cual está relacionado directamente con la generación de la adicción, el consumo crónico de estas puede desencadenar en síndromes de abstinencia cuando su administración se ve bruscamente interrumpida.

¿Qué tienen en común estas sustancias? el elemento común a estas, es el mecanismo farmacológico que las subyace, siendo el sistema GABAérgico el blanco principal de estas drogas.

El impacto de este trabajo radica en el hecho de que nunca antes se había realizado el modelo de SAG en la rata hembra, con características anatómicas cerebrales distintas al macho, así como la obtención de mediciones conductuales durante estadios tempranos de abstinencia a GABA. El SAG actúa como modelo análogo a los síntomas de abstinencia que pueden generar las sustancias que modulan al GABA y por lo tanto, en la medida en que podamos elucidar estos mecanismos llegaremos a una mayor comprensión sobre los elementos cerebrales que componen a la generación de la adicción, así como el impacto que tiene el mantenimiento y la abstinencia en las conductas de mamíferos hembras.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La abstinencia a drogas que modulan la actividad GABAérgica es muy frecuente, se desconoce el impacto que el desequilibrio de la función inhibitoria cortical puede causar en la aparición conductas asociadas a la ansiedad y depresión. Se sabe que las estructuras que participan en estas conductas son las mismas, que el GABA tiene una importante participación y que su ausencia promueve la manifestación de estos trastornos (Möhler, 2012; Martínez- Mota, Ulloa, Herrera-Pérez, Chavira, Fernández-Guasti, 2011; Martín-García et al., 2007; Detke y Lucky, 1996).

6. OBJETIVO

El propósito general de esta tesis fue identificar las modificaciones electrofisiológicas asociadas a cambios en la conducta sexual y en conductas asociadas a la ansiedad y la depresión que subyacen al SAG en la rata hembra.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar los cambios EEG del SAG en etapas tempranas mediante el análisis de complejos espiga onda y de la potencia del registro EEG en la rata hembra.
- 2) Evaluar el impacto de la abstinencia a GABA en la inducción de la conducta sexual de las ratas hembra a través del cociente de lordosis.
- 3) Realizar una medición de la conducta de ansiedad con la prueba del Laberinto Elevado en Cruz durante las fases tempranas del SAG.
- 4) Cuantificar la conducta depresiva en el paradigma del Nado Forzado durante las fases tempranas del SAG.

7. HIPÓTESIS

Hipótesis General

Si se realiza la interrupción de la instilación intracortical de GABA en la corteza somatomotora derecha de la rata hembra entonces generará cambios EEG y en las conductas: sexual, ansiosa y depresiva.

Hipótesis específicas

Las hipótesis de este trabajo plantean lo siguiente:

- 1) Si se realiza un retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA en la corteza somatomotora de la rata hembra, entonces éste generará cambios a nivel electroencefalográfico que serán demostrados por la aparición de complejos espiga-onda y un aumento de la amplitud del EEG.

El SAG tendrá un impacto a nivel conductual, generando:

- 2) Un aumento en la conducta sexual.
- 3) Inducción de ansiedad.
- 4) Favorecerá la aparición de conducta depresiva en los animales.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 *Lista de materiales*

Sujetos

Ratas hembra cepa Wistar con peso de 200-300g

Material de cirugía de ovariectomía

Algodón y gasas estériles

Sutura estéril Seda Negra Trenzada 2-0 Atramat®

Material de cirugía (pinzas, aguja, tijeras)

Mesa de cirugías

Prueba de conducta sexual

Redondel de acrílico (60cm de diámetro x 40cm de alto)

Aserrín

Jeringas 1ml

Lámpara de escritorio con foco rojo de 40 wats

Mesa de madera blanca

Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC)

Laberinto elevado en cruz (brazos abiertos: BA; 50 x 10cm cada uno y dos con las mismas dimensiones pero con paredes de 40cm de alto denominados brazos cerrados BC, los cuatro brazos se encuentran conectados por un cuadro central de 10 x 10cm, el LEC se encuentra elevado 50 cm del piso).

Prueba de nado forzado (NF)

Vaso de vidrio transparente de 40 cm de altura x 20 cm de diámetro

Termómetro de mercurio

Toallas de papel absorbentes

Cirugía estereotáxica y registro EEG

Estaño para soldar Omega®

Cautín Steren®

Horno esterilizador CRAEdental®

Sistema estereotáxico de una torre: Neuroscience Physiology Research Equipment Stoelting modelo Lab. Standard®

Electrodos epidurales (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre), conectores, cables de registro (5 terminales faradizadas adaptadas a conexión directa con amplificadores Grass)

Cánulas intracorticales (Aguja BD Precision Needle®, 0.60 mmx25 mm)

Amplificadores modelo P511 Grass

Computadora tipo PC-HP

Software de adquisición de señal Poliview16 (National Instruments)

Instilación de GABA

Balanza Analítica

Aguja de instilación (Kendal Monoject®)

Manguera de instilación

Bomba de instilación (KdScientific®)

Análisis estadístico

Software Adq4ch para análisis de señal EEG

Software para análisis y gráficas Sigma Plot

Software para análisis matemático Origin 8

Software para análisis estadístico GraphPad

Registro conductual

Cámara de video (Sony *HandycamMod* DCR SX40) adaptada a una tarjeta digital de PC para almacenar los videos en una computadora PC (HP/compac 6000; software ENLTV).

Sustancias

Pentobarbital sódico (Pisabetal® 6.3g/100ml, México)

Xilocaina® (AstraZeneca S.A de C.V solución inyectable al 2% /50ml)

Antibiótico (bencilpenicilina benzatinica, Amsa Laboratorios® antibióticos de México, S.A. de C.V)

Iodo Povidona (Quiromed® 0.8%, México)

Cloruro de Benzalconio (Antibenzil®, México)

Antiséptico (Microdacyn®,Oculus Technologies de México)

Resina Acrílica (Nic Tone Cross Linked®, mdc dental México)

17-β Estradiol (Sigma-Aldrich®, St Lois, MO U.S.A)

Progesterona (Sigma-Aldrich®, St Lois, MO U.S.A)

Ácido γ-aminobutírico (Sigma-Aldrich®, StLois, MO U.S.A)

Peroxido de hidrógeno (J.T Baker®, USA)

Cloruro de Sodio (J.T Baker®, USA)

Institución

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Neurobiología de la dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRF), el cual cuenta con bioterio, fármacos, equipo y computadoras de análisis necesarios para este trabajo.

Sujetos

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, (N=35) con un peso entre 200-350 g., obtenidas del bioterio del INPRF. Las cuales se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad 12:12. Las ratas se alojaron en cajas de acrílico en grupos de 5 ratas o individualmente después de ser operadas, en ellas tuvieron acceso sin restricción a comida y agua.

8.2 *Cirugías*

Cirugía de ovariectomía (OVX)

Para la extracción de los ovarios, la rata hembra fue anestesiada con pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.), se rasuraron los flancos abdominales. Se aplicó anestesia local (lidocaína). Después de la anestesia, se limpió la zona con isodine, se realizó una incisión usando las tijeras para separar a piel y músculo, se tomó el final de la tuba uterina, cerca del ovario, se ligó con la sutura absorbible y sin causar hemorragia, se cortó el ovario y se cerró la cavidad abdominal. Fue necesario esperar dos semanas para la recuperación post-quirúrgica de la rata hembra antes de cualquier otra manipulación, en ese tiempo también se reducen los niveles endógenos tanto de estradiol como de P.

Cirugía estereotáxica

Una vez recuperados de la cirugía OVX, los animales fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas y electrodos por lo que fue necesario anestesiarse a los animales con pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.)

con una pequeña dosis de lidocaína en los auriculares. Una vez anestesiado el animal se colocó en un sistema estereotáxico de una torre, se esterilizó la zona con isodine, se le inyectó lidocaína vía subcutánea en el cuero cabelludo, posteriormente se realizó un corte en la piel.

Se colocaron 2 cánulas de infusión intracortical en la corteza somatomotora con las siguientes coordenadas: 1.5 mm de profundidad, 2.0 mm posterior a bregma, 2.5 mm de la línea media. Asimismo, se colocaron 3 electrodos de registro en el cráneo (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre, dos de registro 4.0 mm posterior a bregma y uno de referencia sin actividad anterior a bregma) de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998). Las cánulas y los tres electrodos se unieron a un conector y fueron fijados al cráneo con cemento acrílico; con el fin de asegurar la permeabilidad de las cánulas se les introdujo una “guía removible”. Al término de la cirugía se les administró un antibiótico de forma profiláctica. Todos los animales tuvieron siete días para recuperarse de la cirugía (figura 6).

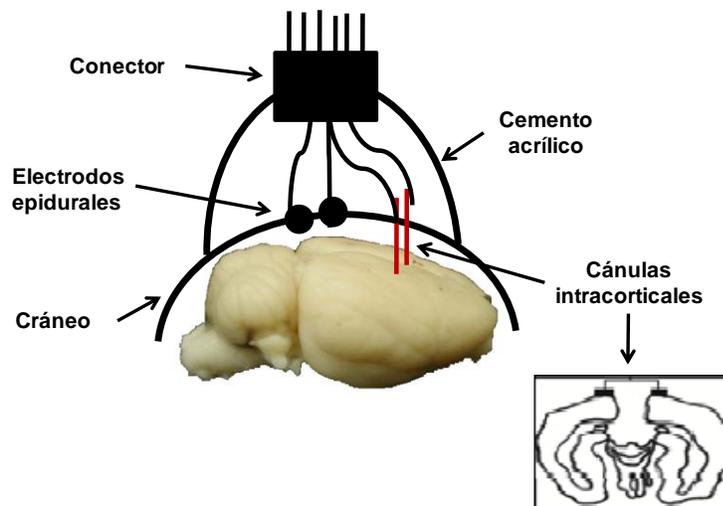


Figura 6. Diagrama de colocación de electrodos y cánulas en la rata. Esquema del plano sagital que muestra el circuito de conexión entre los electrodos el conector, así como la representación del lugar de infusión de las cánulas en el cerebro de la rata.

8.3 *Hormona priming*

Con el objetivo de inducir el estado de estro (fase receptiva de la rata hembra) en la rata OVX, se administró dosis única subcutánea de 0.1 ml de E (10 µg/ml) para sensibilizar e inducir la expresión de los receptores a P, 1 semana antes de comenzar con el tratamiento hormonal (estro inducido).

8.4 *Instilación intracortical de GABA (inducción del SAG)*

Para inducir el estado de abstinencia en los animales experimentales se realizó una infusión intracortical de GABA en la corteza (Cx) somatomotora derecha usando la cánula de instilación previamente colocada, una vez que se removió la guía removible de la cánula, se adaptó una manguera con una aguja insertada a la cánula y a la vez directamente conectada a la bomba de instilación programada para instilar la cantidad de 6 µl de GABA a una concentración de 5 mM durante 2h (1 µl/seg). Al terminar la instilación se colocó nuevamente la guía removible y se prosiguió con el registro EEG inmediato.

8.5 *Instrumentos y equipo de evaluación*

Registro EEG

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 software Poliview 8 (National Instruments) en una computadora y analizados con el sistema Adq4ch mediante el uso de filtros digitales de 0-40 Hz y eliminación de saturación. Se realizó conteo de espigas y análisis de potencia con el uso del espectro de frecuencia de Wavelets.

Conducta sexual

El registro de la conducta sexual se realizó en un redondel de acrílico (60 cm de diámetro x 40 cm de alto) con una cama de aserrín de 5 cm e iluminado con

luz roja (40 W), se colocó a la rata macho sexualmente experta durante 5 minutos para su habituación, posteriormente se ubicó a una rata hembra en fase de estro inducido (previa administración de E: 0.1ml; 10 µg/ml; y P: 0.1 ml ; 2 mg/ml; 48 y 4 h antes de la evaluación respectivamente). En esta prueba se cuantificó el número lordosis así como el cociente de lordosis, el cual se adquiere a través de la siguiente fórmula: número de montas / número de lordosis X 100, el número resultante es el cociente de lordosis que indica el desempeño sexual de la rata hembra (Fernández-Guasti, Larsson y Beyer, 1986).

Laberinto elevado en cruz (LEC) para evaluar conducta ansiosa

Para evaluar la conducta de ansiedad en los roedores utilizamos el laberinto elevado en cruz (LEC), el cual es un paradigma ampliamente utilizado para evaluar los efectos ansiolíticos y ansiogénicos provocados por distintos tratamientos (ver figura7).

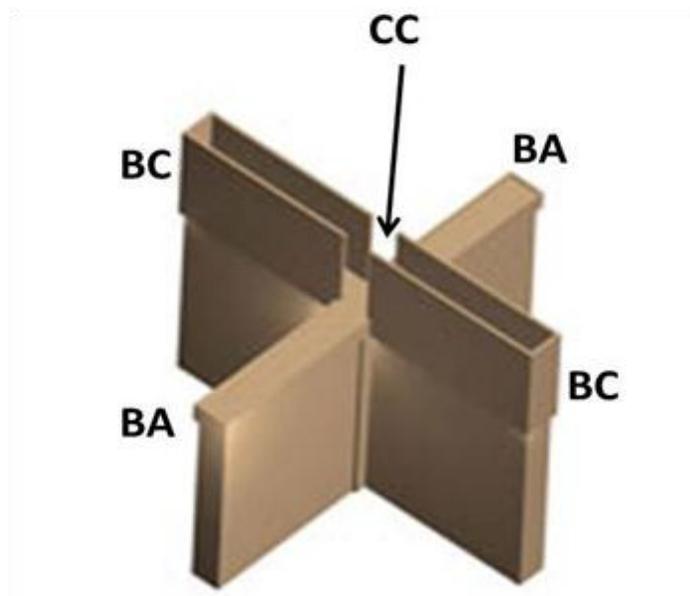


Figura 7. Laberinto Elevado en Cruz (LEC). (BA) Representan los brazos abiertos, cuyas dimensiones son de 50 x 10 cm cada uno, (BC) son los brazos cerrados que tiene paredes elevadas de 40 cm, con las mismas dimensiones que BA, (CC) cuadro central de 10 x 10 cm que une los cuatro brazos. El LEC se encuentra a 50 cm del piso.

Durante la realización de la prueba se iluminó con luz roja (40 W), se colocó a la rata en el centro del LEC con la cabeza hacia uno de los BA durante un periodo de 5 min. Se evaluó: 1) el número de entradas a BA y BC; así como, 2) el porcentaje de tiempo en cada uno de los brazos. El criterio para considerar una entrada es que la rata haya cruzado con las cuatro patas hacia el interior de los mismos.

En este paradigma, un incremento en el tiempo invertido y el número de entradas a los BC es interpretado como una respuesta ansiogénica, mientras que el número total de entradas a ambos brazos, proporciona una medida de la actividad general (Fernández- Guasti y Picazo, 1999; Pellow et al., 1985).

Nado forzado (NF) para evaluar conducta depresiva

En un cilindro de vidrio templado (40 cm de altura x 20 cm de ancho), con 27 cm de agua a una temperatura de 25 ± 1 °C se colocó al animal en el agua durante 15 minutos en la primera fase, la cual induce estrés agudo ya que el animal no puede escapar de la situación amenazante, exactamente 24 h después de la primera exposición se colocó al animal en las mismas condiciones, en esta segunda fase, tras este estímulo estresante se identifica un incremento en la conducta depresiva o pasiva (inmovilidad) en la cual el animal sólo realiza los movimientos necesarios para mantenerse a flote (figura 8).

En este modelo identifican dos tipos de conductas: las primeras, denominadas activas incluyen la conducta de nado que integra movimientos de búsqueda y sumergimiento al fondo del vaso y la conducta de trepado, que se expresa con movimientos vigorosos de las patas delanteras, por lo general contra el cristal.

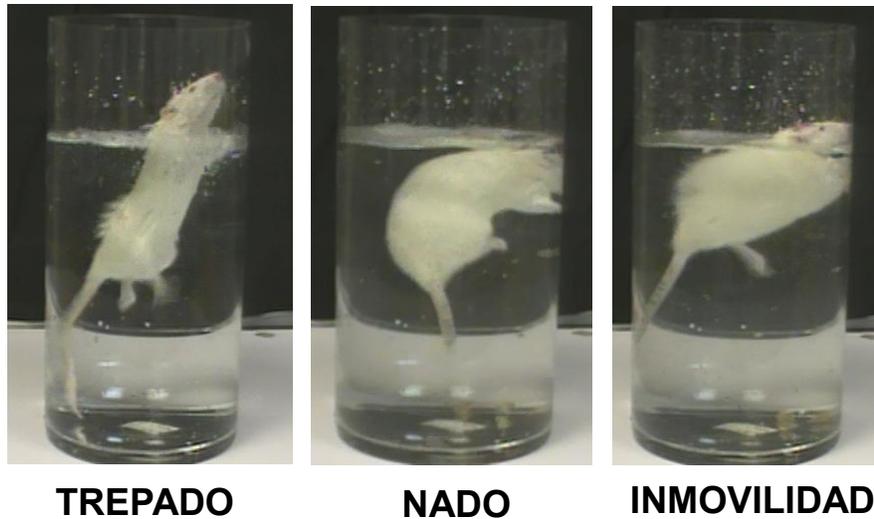


Figura 8. Prueba de Nado Forzado (NF). Se muestran gráficamente cada una de las conductas evaluadas durante la prueba de nado forzado en un intervalo de 5 min. La conducta de inmovilidad es la que se encuentra vinculada a un estado depresivo en los animales.

Dentro del segundo tipo de conducta se encuentra la conducta pasiva en donde se ubica la inmovilidad, esta es identificada porque el animal realiza únicamente los movimientos necesarios para mantenerse a flote o bien permanece prácticamente sin moverse, esta última, es aquella que ha servido como un indicador de la presencia conductas depresivas. La prueba más contundente de ello es la farmacológica, al administrar fármacos antidepresivos las ratas pueden aumentar las conductas activas significativamente (Porsolt et al., 1978).

En la prueba del NF se cuantificó el número de episodios de las conductas de nado, trepado e inmovilidad en periodos de 5 segundos (Dekte y Lucki, 1996).

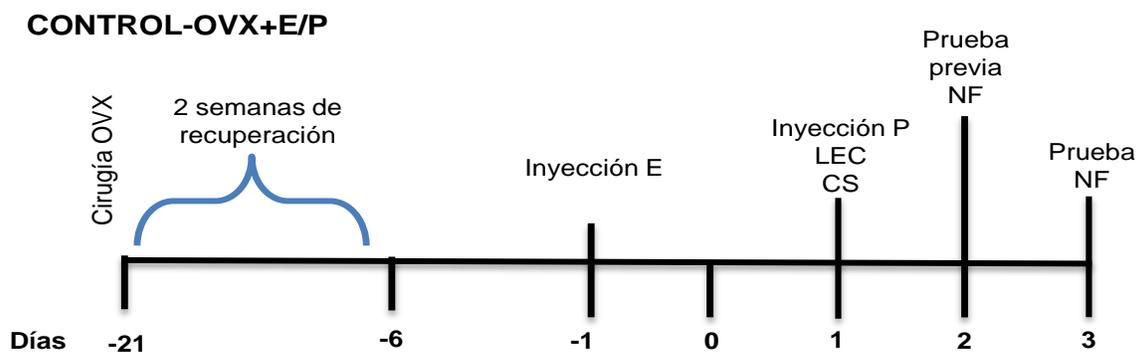
El análisis se realizó fuera de línea, todas las conductas fueron videograbadas mediante el uso de una cámara de video (Sony HandycamMod DCR SX40) y almacenadas en PC (software ENLtv) para análisis subsecuente.

8.6 Diseño experimental

El diseño experimental constó de 5 grupos: 1) **CONTROL-OVX+E/P** N=9, 2) **SHAM-OVX+E/P** N=6, 3) **SAG-OVX+E/P** N=9, 4) **SAG-OVX** N=6 y 5) **Grupo de seguimiento (SAG-OVX+E/P)** N=5, por lo que realizó un análisis de grupos independientes, a excepción del grupo de seguimiento, en el cual se hizo una medición longitudinal durante 10 días.

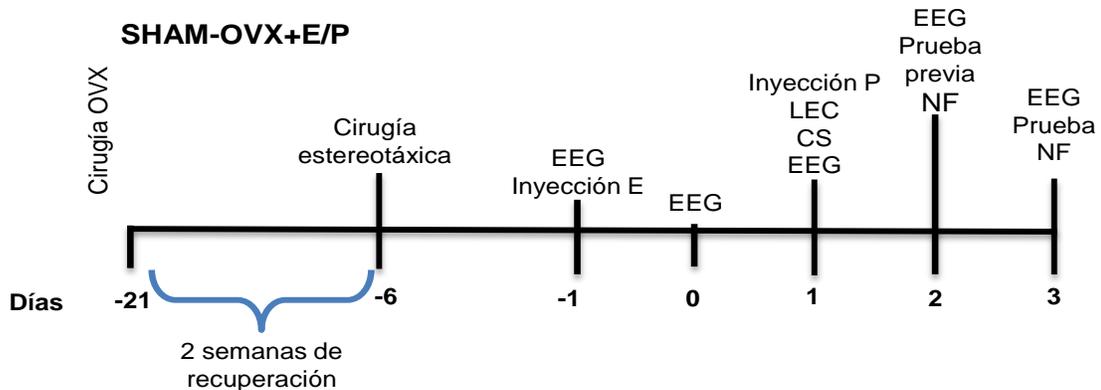
8.7 Experimentos

Para el grupo **CONTROL-OVX+E/P** se realizó la cirugía de OVX, 6 días después de la recuperación (previa sensibilización a hormonas) se aplicó estradiol (0.1ml). Dos días después se realizaron las pruebas conductuales: LEC para la evaluación de la ansiedad e inmediatamente después se midió la conducta sexual, al día siguiente se realizó la fase de prueba previa del protocolo de nado forzado y 24 horas después se prosiguió con la segunda fase de dicha prueba. Este grupo fue realizado para conocer el comportamiento de los animales en un estado sin manipulación experimental que proporcionó una línea base del comportamiento inicial.



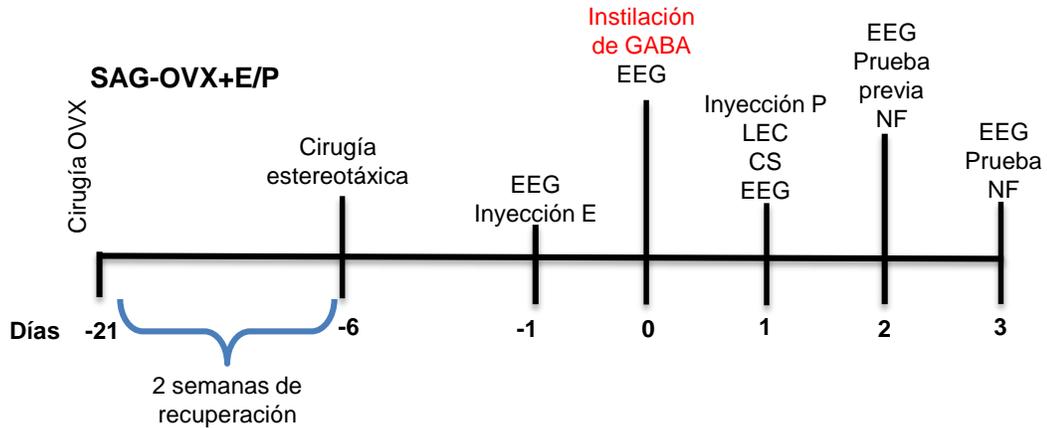
E (estradiol); **P** (progesterona); **LEC** (Laberinto elevado en cruz); **NF** (Nado forzado); **CS** (Conducta sexual). **0** se refiere al tiempo que coincide con la instilación de GABA y que en este grupo no se realizó.

En el grupo **SHAM-OVX+E/P** se realizó la ovariectomía, después de la recuperación, se sometió a cirugía estereotáxica y sensibilización a hormonas. Una semana después se hizo un registro EEG los días de las mediciones conductuales. Este grupo se realizó con la finalidad de conocer el efecto de la cirugía estereotáxica sobre la conducta y la actividad EEG de los animales



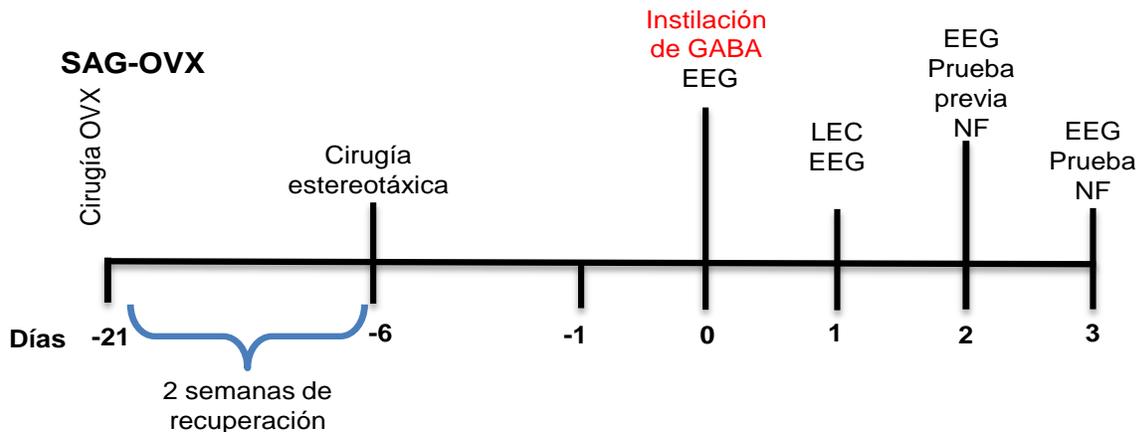
EEG (electroencefalograma); **E** (estradiol); **P** (progesterona); **LEC** (Laberinto elevado en cruz) **NF** (Nado forzado); **CS** (Conducta sexual). **0** se refiere al tiempo que coincide con la instilación de GABA y que en este grupo no se realizó.

En cuanto al grupo **SAG-OVX+E/P** se realizó la OVX, cirugía estereotáxica y sensibilización a hormonas, una semana después se llevó a cabo la instilación de GABA con las características anteriormente mencionadas (GABA 6µl/5mM/2h/Cx somatomotora derecha), se registró la actividad EEG durante dos horas y a partir del día siguiente, se realizaron las mediciones conductuales. A estos animales se les realizó un registro EEG de 30 min en los 4 días que se realizaron manipulaciones experimentales. Para así evaluar el efecto que tenía el SAG en las tres conductas, así como los cambios a nivel EEG.



EEG (electroencefalograma); **E** (estradiol); **P** (progesterona); **LEC** (Laberinto elevado en cruz); **NF** (Nado forzado); **CS** (Conducta sexual). **0** se refiere al día de la inducción del SAG.

Finalmente, en el grupo **SAG-OVX** se realizó la ovariectomía, cirugía estereotáxica sin remplazo hormonal, por lo que sólo se realizaron las pruebas de Nado forzado (NF) y Laberinto elevado en cruz (LEC), así como la instilación de GABA y el registro EEG. Esto para identificar el efecto de las hormonas (E/P) en la expresión del SAG en la rata hembra.

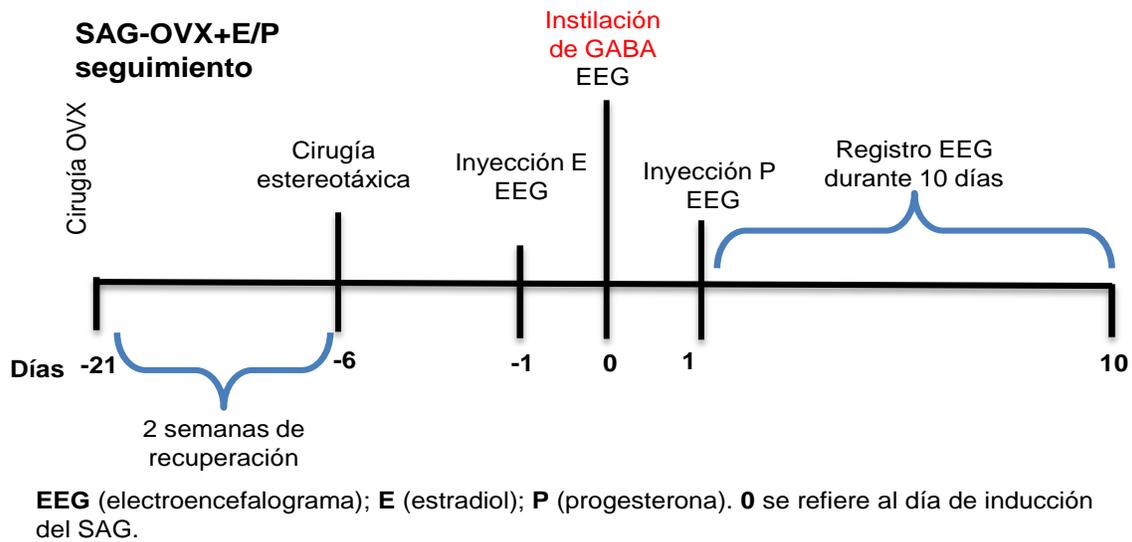


EEG (electroencefalograma); **LEC** (Laberinto elevado en cruz); **NF** (Nado forzado). **0** se refiere al día de inducción del SAG.

Además, se realizó un **grupo de seguimiento (SAG-OVX+E/P)** en el que únicamente se registró EEG, antes y posterior a la instilación de GABA con la

finalidad de obtener un seguimiento del fenómeno durante 10 días; a estos animales se les aplicaron las hormonas pero no se efectuaron las evaluaciones conductuales.

A todos los animales de registro EEG se les realizó un registro control previo a la manipulación experimental, en este caso y en los registros de seguimiento la duración del registro fue de 30 min.



8.8 Análisis estadístico y EEG

Para analizar la conducta, el análisis estadístico que se utilizó fue un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, para comparar las medias en las mediciones conductuales, con una significancia de $p \leq 0.05$, posteriormente se realizó la prueba *post-hoc* de *Dunette* para comparar cada evaluación conductual con el control de la misma.

Los datos de ansiedad, fueron mostrados en proporción, tanto en número de entradas, así como porcentaje de tiempo siguiendo esta ecuación:

$$\frac{tBx}{tBx + tBx} \times 100$$

Donde t es el tiempo y x es el brazo en el que ha permanecido, se continuó la misma ecuación para el número de entradas.

En la prueba de conducta sexual se cuantificó el número de lordosis y el cociente de lordosis, el cual se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{nM}{nL} \times 100$$

Donde nM es el número de montas realizadas por el macho y nL es el número de lordosis que realizó la hembra

En la prueba del NF, se evaluaron el número de eventos de las 3 conductas (nado, trepado e inmovilidad) en periodos de 5 segundos.

El análisis de la señal adquirida en el registro EEG fue el conteo de complejos espiga onda y el análisis de frecuencia de Wavelets, este último es indicado para evaluar una señal que es aleatoria a través del tiempo y que no tiene una frecuencia dominante en alguna banda de frecuencia; por lo tanto este tipo de evaluación es ideal para identificar la hiperexcitabilidad neuronal inducida por el SAG. Los resultados EEG se analizaron mediante un ANOVA haciendo una comparación entre grupos con un valor de $p \leq 0.05$ con una prueba *post-hoc Tukey*.

Para el grupo de seguimiento del registro EEG durante el SAG, el análisis estadístico utilizado fue el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas, con valor de $p \leq 0.05$ y una prueba *post-hoc Tukey*.

9 RESULTADOS

9.1 *Modificaciones de la excitabilidad neuronal inducidas por el SAG.*

El planteamiento inicial de esta tesis fue realizar un análisis EEG que identificara por primera vez a la hiperexcitabilidad neuronal causada por el SAG en la rata hembra, analizando la potencia y el número de complejos espiga-onda en un registro EEG. Para ello utilizamos el análisis Wavelets el cual nos permitió realizar un seguimiento electrofisiológico de una señal aleatoria desde una descripción matemática. Debido a que en un electroencefalograma de hiperexcitabilidad neuronal no existe una función o relación formal que lo describa, de manera que para aplicar algoritmos de análisis numéricos, es necesario utilizar series del tiempo.

En la figura 9, identificamos la transformación cuantitativa que tuvo la señal del EEG antes, durante y después de la inducción de la abstinencia a GABA. El análisis de la actividad basal se encuentra en la frecuencia entre 4-8 Hz y mostró predominio de ondas rápidas de baja potencia, lo cual se identificó en la gráfica con colores azules y verdes (grupo SHAM-OVX+E/P). En contraste, fue posible cuantificar un incremento de la actividad EEG en la inducción del SAG caracterizado por la aparición de complejos espiga-onda, representativos de las abstinencias a drogas GABAérgicas, que previamente se había publicado en los trabajos de Brailowsky et al., (1988); el SAG es una manifestación electrofisiológica caracterizada por complejos rápidos de gran potencia asociados a trenes de descarga de mayor voltaje en la zona instilada, esta actividad en el análisis de Wavelets se identificó como una fase de color rojo-amarillo en su expresión gráfica (una actividad con predominio entre los 3-17 Hz).

La evolución temporal de la actividad EEG mostró como gradualmente desaparece el color rojo, para reaparecer los colores fríos es decir, la hiperexcitabilidad neuronal se reduce cuantitativamente después de la inducción

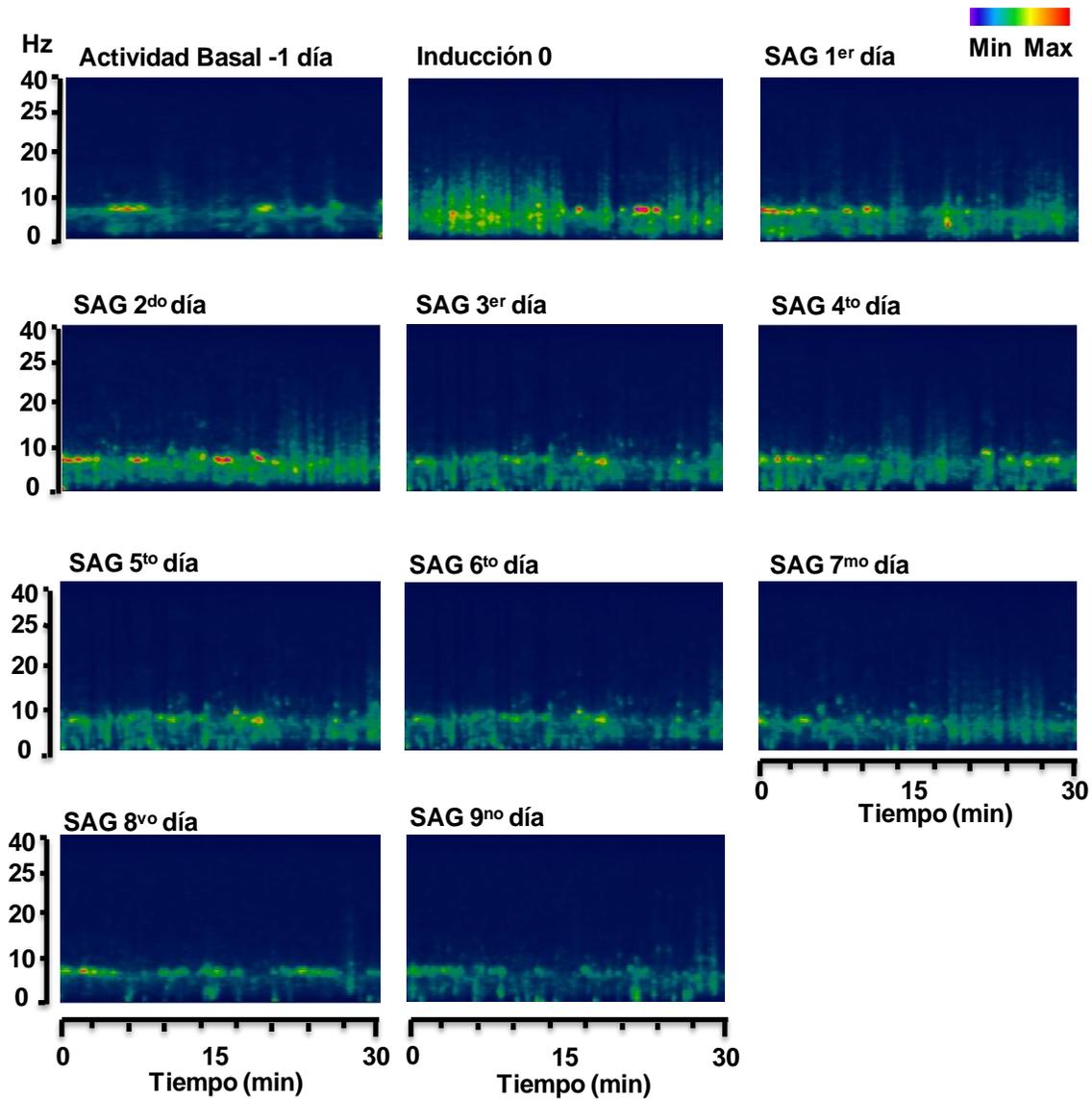


Figura 9. Espectro representativo de potencia de la corteza instilada de una rata hembra realizado en un seguimiento de 9 días. Nótese el aumento de la potencia del EEG reflejado por la aparición de colores cálidos (max) los primeros días de la abstinencia (0-5) lo cual indica un incremento en el espectro de potencia entre 3-17 Hz. La actividad disminuyó con el paso del tiempo hasta llegar a los colores fríos (min) en los últimos días del seguimiento (6-9).

del síndrome. Con este análisis identificamos que el inicio del SAG tuvo una latencia de 15 ± 1.2 minutos y una duración promedio de 5 ± 1 días.

9.2 Análisis del incremento de la frecuencia y la amplitud del EEG durante el SAG.

La potencia promedio antes de la manipulación farmacológica del EEG fue de $505.1 \pm 3.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio derecho y de $498.3 \pm 3.3 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio izquierdo (N=5). Al realizar el análisis cuantitativo del espectro de frecuencia de 4-20 Hz en ambos hemisferios cerebrales durante el SAG, demostramos que la potencia tuvo un incremento en las dos cortezas cerebrales el día de inducción (133%; *día 0* de la figura 10), en el hemisferio instilado (derecho; círculos azul oscuro) fue de $1175.9 \pm 13 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ y en el contralateral fue de $798.3 \pm 13.3 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ (izquierdo; círculos azul claro), con una diferencia significativa comparada con el registro de la línea base (F; 21, 32142; $=247.1$, $p \leq 0.001$). Este incremento disminuye gradualmente en la evolución temporal de la abstinencia. Es importante indicar la existencia de una asimetría en el registro EEG después de la inducción del SAG, en la cual es significativamente mayor la amplitud de la señal en el hemisferio instilado comparado con el hemisferio contralateral ($p \leq 0.001$) y que evoluciona progresivamente hasta regresar a la condición basal 6 días después de la instilación.

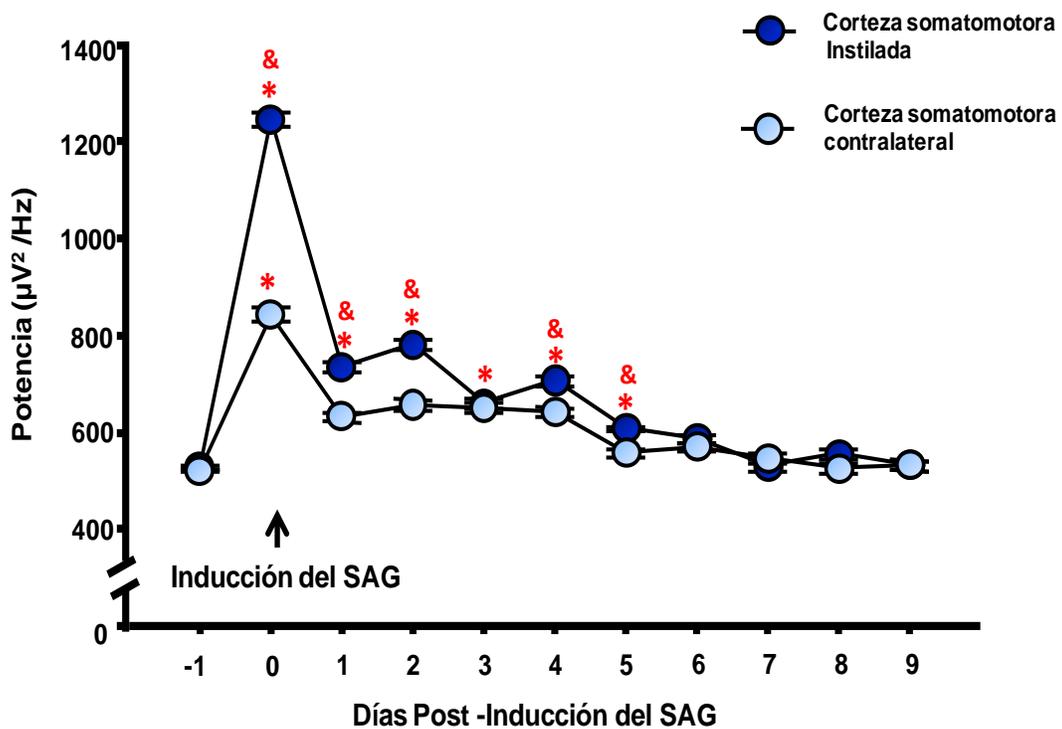


Figura 10. Análisis cuantitativo del espectro de frecuencia (4-20 Hz/30 min) del SAG de ambos hemisferios cerebrales. La flecha negra indica el día de la inducción del SAG. En la gráfica se muestra el incremento significativo de la amplitud del EEG durante 5 días en el proceso de 9 días de seguimiento. La corteza somatomotora a la cual se le instiló GABA (derecha, círculos azul oscuro, N=5) manifiesta una mayor actividad neuronal los 3 primeros días del SAG; en la corteza somatomotora contralateral (izquierda, círculos azul claro, N=5) sólo se identifica un incremento significativo el día de la inducción de la abstinencia. Se grafica el promedio de la potencia \pm Error Estándar (EE) ANOVA *post-hoc Tukey* (* $p \leq 0.05$ intra-grupos; & ≤ 0.05 entre hemisferios).

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

Además del análisis del incremento de la potencia del EEG que genera el SAG, en esta tesis fue necesario cuantificar el número de complejos espiga-onda de alta frecuencia y de gran amplitud que caracterizan a fenómenos de hiperexcitabilidad neuronal como las epilepsias.

Cuantificamos el número de complejos espiga-onda posterior a la inducción y durante la evolución temporal del SAG. El día 0 (inducción) se cuantificaron 1740 ± 260 espigas/30 min en el hemisferio instilado (figura 11; círculos azul oscuro; F; 10, 4; $=9.23$, $p \leq 0.001$), lo cual equivale a 0.9 espigas/seg.

El *día 1* posterior a la inducción del SAG (figura 11), el número de los complejos espiga-onda en ambos hemisferios disminuyó ($360 \pm 12/30$ min) para después aumentar en los 4 días siguientes (día 2-5; $780 \pm 10/30$ min). A partir del día 6, no hubo diferencias significativas con respecto a la actividad basal del EEG de ambos hemisferios. La hiperexcitabilidad neuronal del SAG se propagó al hemisferio contralateral.

Esta serie de resultados demostró que el SAG en la rata hembra: **1)** tiene un comportamiento electrofisiológico en el cerebro tendiente a una hiperexcitabilidad neuronal (actividad de alta frecuencia en un espectro de 3-17Hz, con latencia de aparición de 15 min) y **2)** la actividad epiléptica del hemisferio instilado, la cual se propaga al hemisferio contralateral, disminuye paulatinamente hasta desaparecer al 5^{to} día.

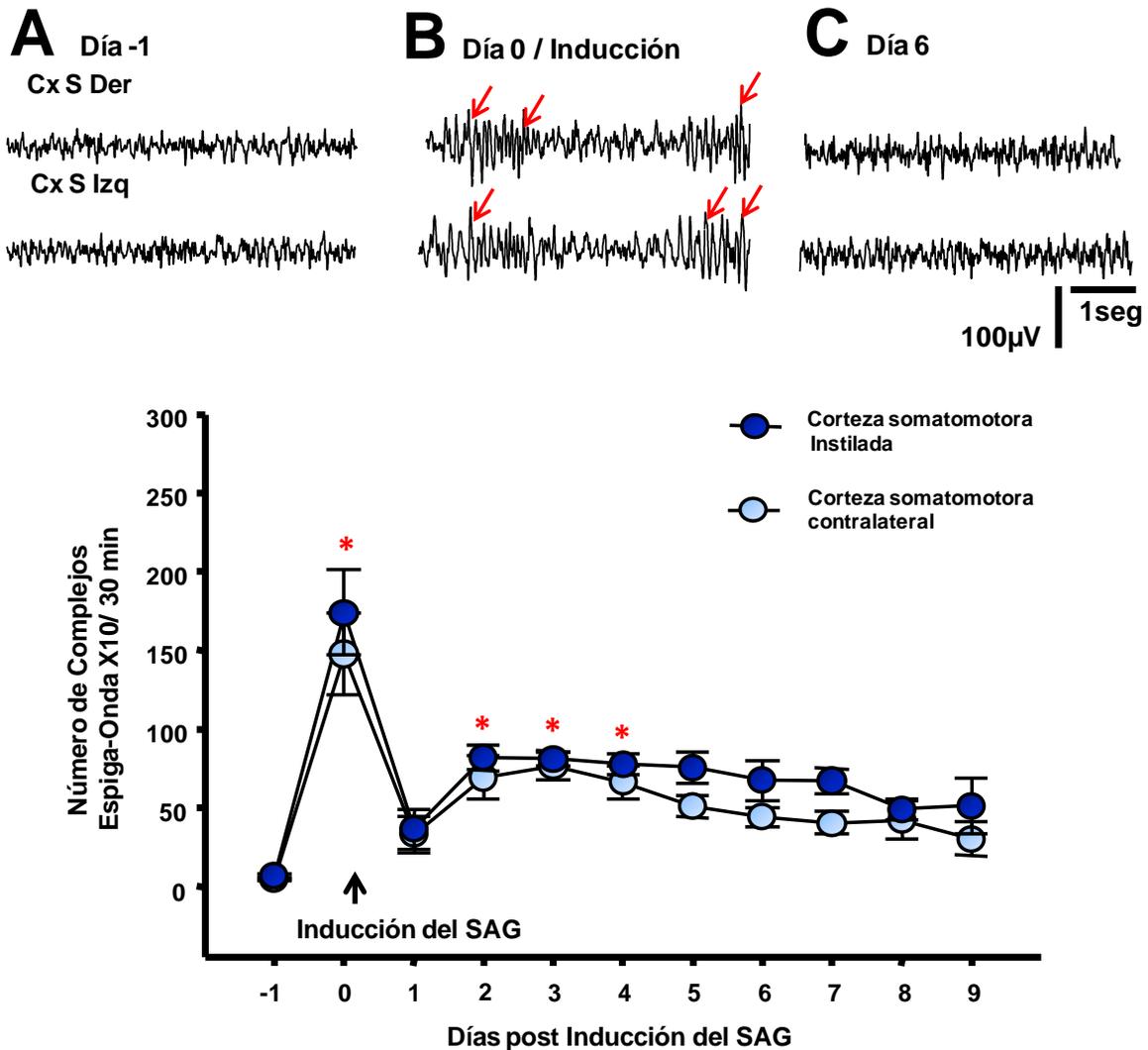


Figura 11. Incremento de la Actividad neuronal de la Corteza Somatomotora durante el SAG. En la parte superior se muestran trazos representativos del registro EEG en diferentes fases del experimento. **A)** Actividad control/ basal; **B)** Inducción del SAG y, **C)** 6 días después de la inducción del SAG. La escala muestra (Cx S: corteza somatomotora, Der: derecha- instilada; Izq: izquierda-contralateral). La escala muestra 1seg y 100µV. En la parte inferior se grafica el análisis de la comparación entre la actividad neuronal de la corteza somatomotora instilada (derecha, círculos azul oscuro,) con la corteza contralateral (izquierda, círculos azul claro; N=5) durante el seguimiento de nueve días. La corteza en la que fue instilada el GABA tiene mayor hiperexcitabilidad posterior a la interrupción abrupta de su aplicación. Se graficó el promedio de complejos espiga-onda/30 min \pm EE ANOVA *post-hoc* Tukey ($*\leq 0.05$ intragrupos; & ≤ 0.05 entre hemisferios).

9.4 Efecto de la Ovariectomía en la Hiperexcitabilidad Neuronal inducida por el SAG

Los siguientes resultados se obtuvieron en la búsqueda de identificar el efecto de la ausencia de las hormonas sexuales (E y P) en los cambios de la excitabilidad neuronal del SAG y su impacto sobre las conductas de estudio de esta tesis (conducta sexual, ansiosa y depresiva).

Como demostramos anteriormente, los animales hembra son susceptibles a generar un SAG con una latencia corta (15 min) y una duración de aproximadamente 5 días. Sin embargo, no conocíamos cuál era el efecto de la ovariectomía en el estado inicial del SAG. Estudios previos (Majewska, et al., 1986; Smith, et al., 2007) demostraron que las hormonas esteroides femeninas (E) así como los progestágenos (P y AloP) son agentes moduladores alostéricos del receptor GABA_A y pueden disminuir la excitabilidad cerebral dependiendo de su concentración. Es conocido en el campo de las neurociencias que la P y AloP en las neuronas incrementa la corriente de cloro dependiente de GABA, reduce las corrientes de Ca²⁺ tanto de canales dependientes de voltaje como la mediada por el receptor NMDA, en tanto que los estrógenos reducen la corriente GABAérgica e incrementan la glutamatérgica (Martín-García, et al., 2007; Schumacher et al., 2003).

Para confirmar que la cirugía estereotáxica no tuvo efecto en la actividad EEG basal de las ratas hembra y durante el protocolo experimental, se conformó un grupo de ratas hembra a las que solo se les implantaron cánulas/electrodos de registro, pero sin manipulación farmacológica. En estos animales, el espectro de frecuencia de Wavelets mostró que la actividad del EEG basal se mantuvo con una frecuencia de banda entre 4-10 Hz, que corresponde a colores azules-verdes en la expresión gráfica (figura 12 A, Grupo SHAM-OVX+E/P), este resultado muestra que la cirugía estereotáxica y la cicatriz quirúrgica no modificaron la actividad basal del EEG.

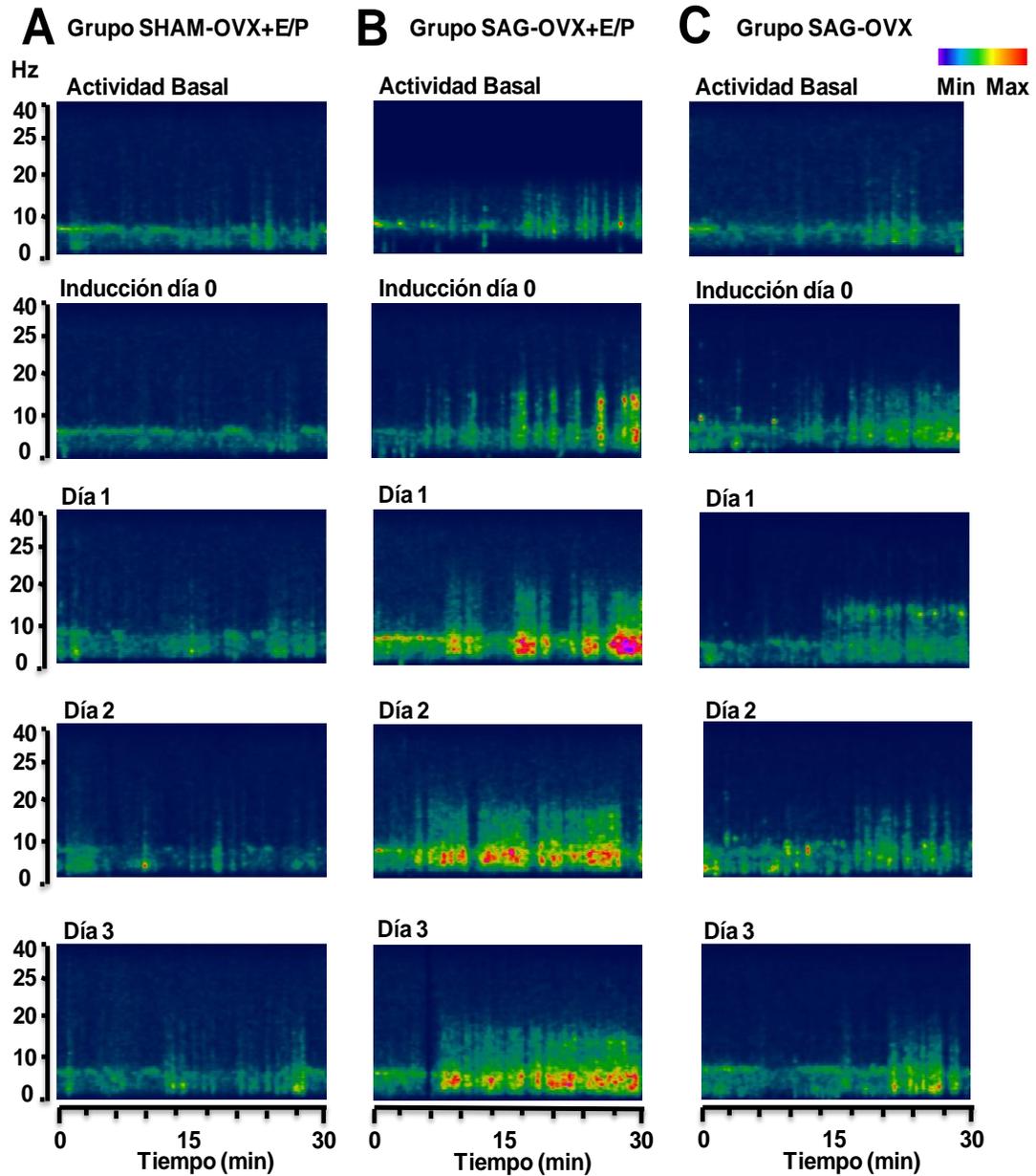


Figura 12. La manifestación de la hiperexcitabilidad neuronal del SAG es mayor en la rata OVX con remplazo hormonal. Se muestra la potencia del EEG representativa de cada grupo en un seguimiento de 3 días. En **A)** los espectros de potencia de un animal ovariectomizado (OVX) sin modificación farmacológica hace evidente que la potencia del EEG se mantiene constante; **B)** Nótese el incremento en la actividad cortical del SAG en los animales OVX con remplazo hormonal (la aplicación intracortical de GABA fue precedida de la aplicación de E), el aumento en la actividad del EEG se ve reflejado con la aparición del colores rojo-amarillo (max) en contraparte el color azul que refleja una actividad basal (min, barra superior derecha); **C)** representa el análisis de la potencia del SAG en animales OVX sin remplazo hormonal, es evidente como este grupo tiene un incremento de la actividad neuronal por la abstinencia a GABA pero ésta, es significativamente de menor magnitud que el grupo SAG con remplazo hormonal.

A los animales que se les realizó ovariectomía sin la administración de hormonas (N=6), se les instiló GABA en la corteza somatomotora derecha (5mM/6µl, 2h). El análisis del Wavelets mostró que estos animales son igualmente susceptibles de generar hiperexcitabilidad cortical por la abstinencia a GABA que los animales que tuvieron remplazo hormonal, no obstante existe una tendencia a generar una hiperexcitabilidad de menor amplitud y frecuencia a la que se produce en animales con remplazo hormonal (figura 12 B y C, respectivamente).

Contrastando los datos anteriores, al hacer un análisis cuantitativo en la potencia y la frecuencia del EEG en los grupos con SAG-OVX+E/P y SAG-OVX sin aplicación de hormonas, se cuantificó que no existen diferencias en la potencia de la actividad EEG el día previo a la instilación ($571.1 \pm 6.5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ y $577.6 \pm 4.1 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ respectivamente, *día -1* figura 13) es decir, que la actividad basal del EEG de los animales OVX no se modifica por la ausencia de hormonas (E y P).

El día de inducción del SAG (*día 0* de la figura 13), la amplitud promedio del EEG fue de $1098.1 \pm 13.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ para el grupo SAG-OVX+E/P (figura 13 A, triángulos invertidos; N=9; $p \leq 0.001$); el cual representa un 92% de incremento comparado con el registro EEG control. A diferencia de este resultado, al grupo de ratas hembras SAG-OVX se le cuantificó una amplitud de $955.9 \pm 10.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, lo que equivale a un incremento del 65% sobre la línea base (figura 13 A, cuadros; N=6; F; 14,27750; $=746.53$ $p \leq 0.001$), es decir, que la expresión de hiperexcitabilidad neuronal de los animales con SAG-OVX+E/P fue significativamente mayor en comparación con la registrada en los animales OVX sin remplazo hormonal.

La actividad epileptiforme del SAG durante la evolución temporal disminuye paulatinamente (figura 13 A y B, triángulos invertidos y cuadros) en ambos grupos. El día 1 posterior a la inducción del SAG, la amplitud del EEG de los animales con remplazo hormonal disminuyó ($810.7 \pm 11.5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; figura 13; triángulos invertidos). El análisis electrofisiológico del hemisferio contralateral a la instilación de GABA, permitió identificar que existe un aumento discreto en la amplitud del

EEG de 66% ($854.7 \pm 8.5 \mu V^2/Hz$) en el grupo de animales SAG-OVX+E/P (figura 13 B, triángulos invertidos; N=9; $p \leq 0.001$), el cual presentó diferencias significativas con el grupo de animales SAG-OVX cuyo incremento fue de 41% ($739.2 \pm 4.9 \mu V^2/Hz$; figura 13 B, cuadros; N=6; $p < 0.001$).

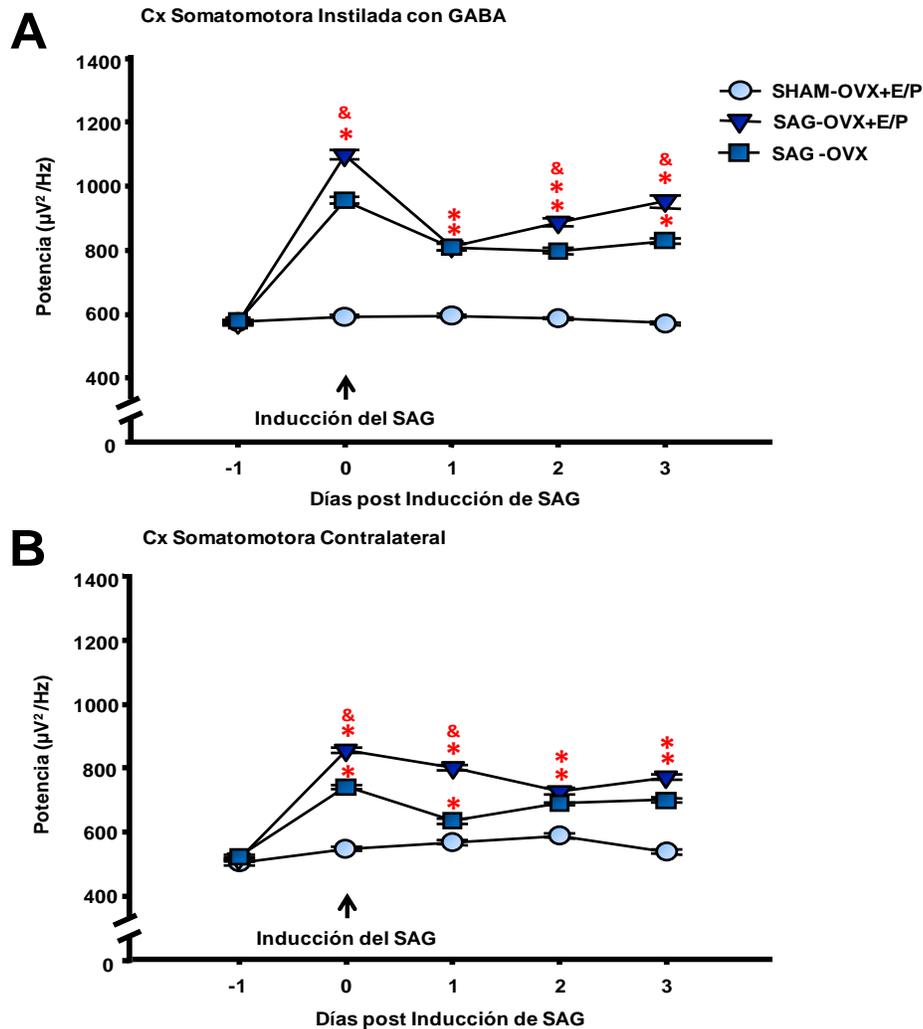


Figura 13. Análisis cuantitativo de la amplitud del EEG en la banda de 4-20 Hz/ 30 min de los estadios iniciales del SAG. La inducción del SAG es indicada con una flecha negra (día 0). En **A** se grafica la potencia del EEG de la corteza somatomotora instilada (derecha). El grupo de animales de SAG-OVX con remplazo hormonal (triángulos invertidos; N=9) muestran una diferencia significativa en el incremento de la potencia con respecto a los animales con SAG-OVX sin aplicación de hormonas (E+P; cuadros; N=6; $p \leq 0.001$). El grupo control SHAM-OVX+E/P (círculos; N=5) muestra claramente que la cirugía sin manipulaciones farmacológicas no induce modificaciones en el EEG. **B**) La corteza contralateral (izquierda) a la instilación de GABA muestra propagación de la hiperexcitabilidad: se muestra un perfil semejante a la corteza derecha, sin embargo de menor potencia que el instilado. Las gráficas muestran el promedio de la potencia del EEG ($\mu V^2/Hz/ 30 \text{ min} \pm E.E$) ANOVA *post-hoc Tukey* (* $p \leq 0.05$ intra-grupos; & ≤ 0.05 entre grupos).

Al analizar la actividad EEG se identificó que los animales SHAM-OVX+E/P no mostraron cambios (descargas epileptiformes, espigas-onda o asimetría) en la actividad electrofisiológica de la línea basal durante los 5 días de seguimiento (figura 14 A).

La latencia promedio de la primera espiga del SAG en los animales SAG-OVX fue de 15.2 ± 1.2 min, en comparación con los animales SAG-OVX+E/P en los que se les cuantificó 16.3 ± 1.7 min; esta diferencia no es estadísticamente significativa, con lo anterior queda de manifiesto que la latencia del SAG no se modifica por la ausencia o presencia de hormonas sexuales femeninas, sin embargo si hay una modificación en la expresión del fenómeno epileptiforme que caracteriza al SAG.

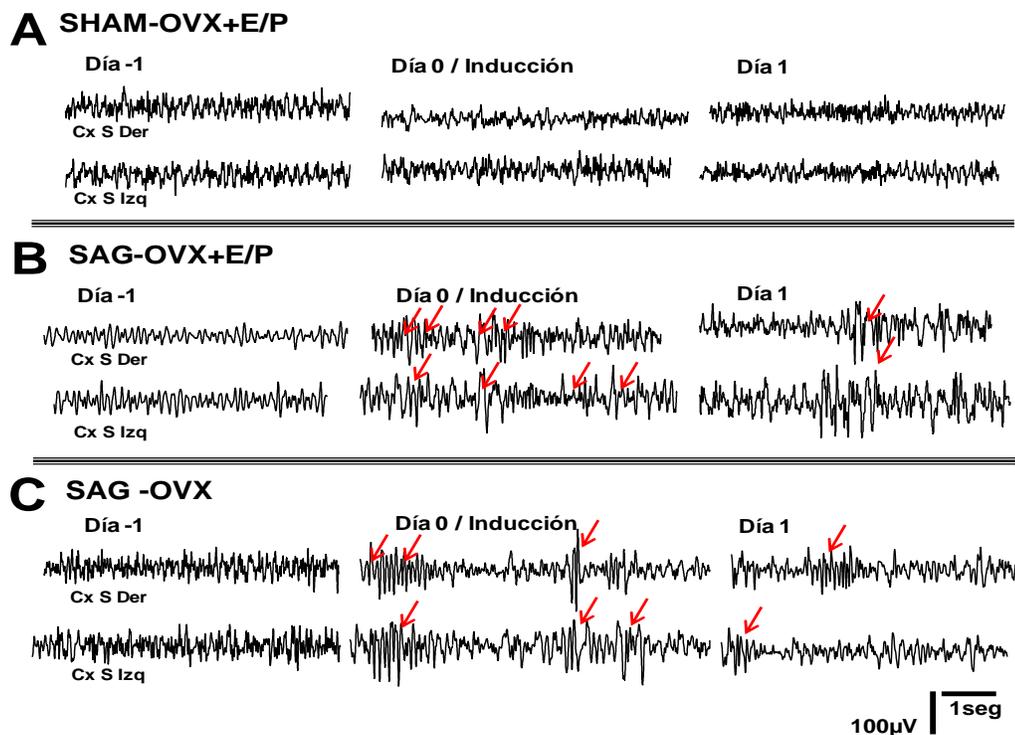


Figura 14. Muestra gráfica de la actividad espiga-onda en el registro EEG durante la fase inicial del SAG. En A) (Control-SHAM-OVX+E/P) no hay diferencias de las ondas del registro en diferentes días del experimento, **en B)** (SAG-OVX+E/P) se muestra la aparición de complejos espiga-onda (señalados por flechas) así como el aumento en la amplitud de la actividad EEG y se manifiesta 1 día después de la inducción. **C)** (SAG-OVX) El SAG en este grupo induce la aparición de la actividad epileptiforme, pero de menor actividad y propagación. La escala muestra 1 seg y 100 µV (Cx S: corteza somatomotora, Der: derecha- instilada; Izq: izquierda-contralateral).

El análisis del conteo de complejos espiga-onda en las primeras horas de la abstinencia a GABA entre ambos grupos evidenció que: **1)** los animales con SAG y remplazo hormonal tienen en promedio 1730 ± 220 complejos espiga-onda/ 30 min de registro, esto equivale a 0.9 espigas/seg (figura 15 A; triángulos invertidos; F; 9, 60; $t = 21.28$, $p \leq 0.001$) y **2)** al grupo de animales SAG-OVX sin remplazo hormonal le fueron cuantificados en promedio 540 ± 80 espigas en el mismo lapso es decir 0.3 espigas/seg (figura 15 A, cuadros); la manifestación inicial del SAG es menor en ausencia de hormonas sexuales.

El fenómeno de hiperexcitabilidad de la inducción del SAG se invierte 24 h después, el número de espigas en el EEG de los animales con remplazo hormonal disminuye significativamente, se cuantificaron $270 \pm 60/30$ min complejos espiga-onda, en cambio, al EEG del grupo de animales SAG-OVX se le identificaron 650 ± 100 (triángulos invertidos y cuadros respectivamente *días 0* y *1* figura 15 A; $p \leq 0.001$).

A partir del segundo día después de la inducción del SAG no existen diferencias significativas en el número de complejos espiga-onda entre el grupo de ratas con remplazo hormonal y el grupo de animales ovariectomizados ($690 \pm 90/30$ min y $510 \pm 60/30$ min en los *días 2* y *3* respectivamente figura 15 A triángulos invertidos y $700 \pm 60/30$ min y $440 \pm 60/30$ min cuadros; $p \leq 0.001$).

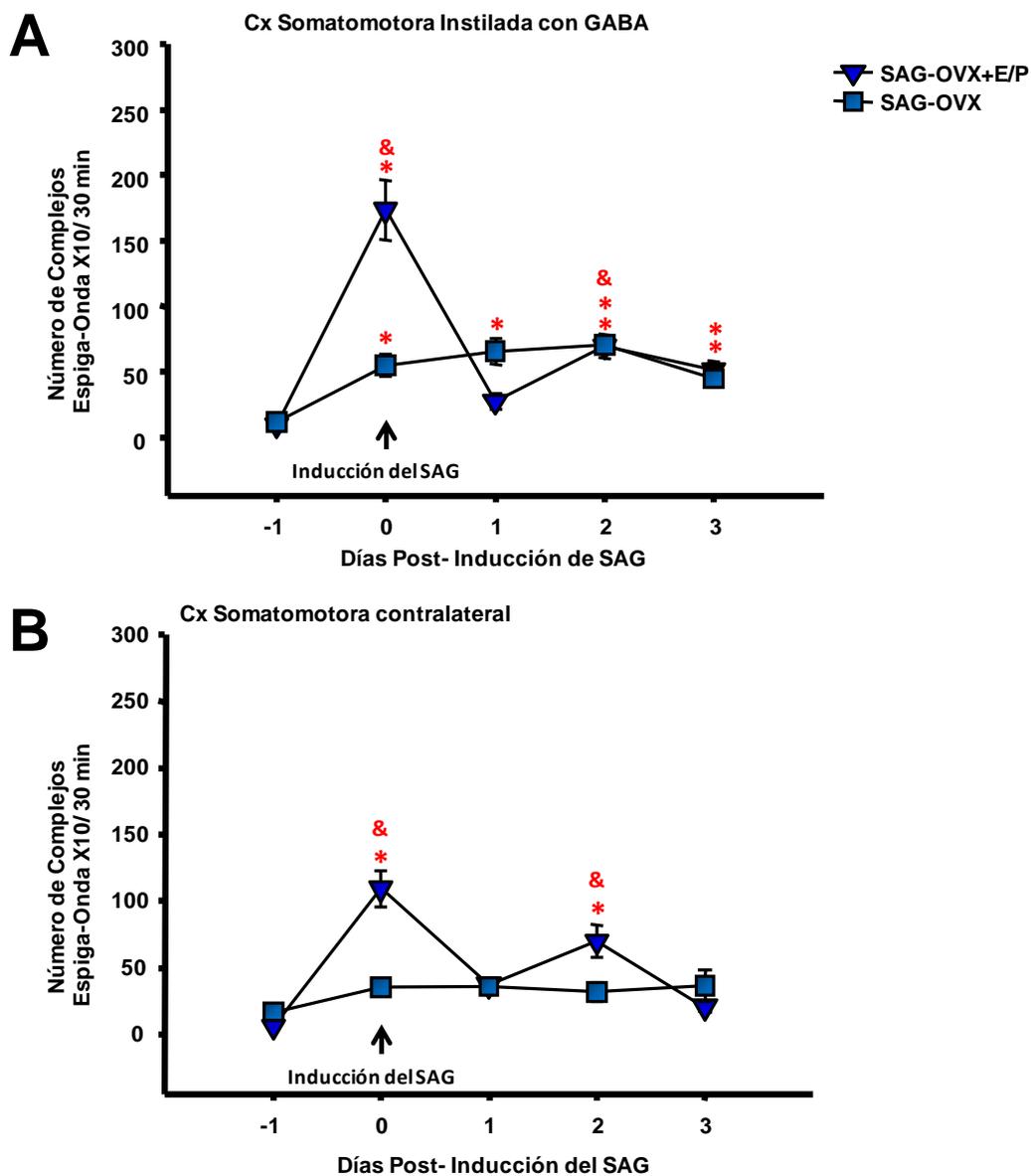


Figura 15. Análisis matemático de la actividad espiga-onda en el registro EEG durante la fase inicial del SAG. Se muestra el número de complejos espiga-onda en periodos de 30 min durante diferentes días de seguimiento del EEG. En **A**) la corteza instilada (derecha), la inducción se manifiesta por un incremento significativo de los eventos epileptiformes, esto con mayor magnitud en el grupo de animales SAG-OVX con remplazo hormonal (triángulos invertidos; N=9; $p \leq 0.001$) en relación a los animales SAG-OVX sin administración de hormonas esteroides (cuadros; N=6). En el mantenimiento de la abstinencia, ambos grupos son semejantes en la expresión del incremento de la hiperexcitabilidad. En **B**) se muestra el análisis de la corteza contralateral (izquierda) de lo cual se traduce el proceso de propagación de la hiperexcitabilidad. El perfil de hiperexcitabilidad de este hemisferio es semejante al derecho: el grupo SAG-OVX+E/P muestra mayor número de eventos espiga-onda. Cada punto representa el promedio del número de complejos espiga-onda/30 min \pm E.E. ANOVA *post-hoc* Tukey ($*p \leq 0.05$ intra-grupos; $\& \leq 0.05$ entre grupos).

Los datos anteriores muestran que la evolución temporal de la hiperexcitabilidad neuronal tiene una disminución considerable el día siguiente a la inducción de la abstinencia en los animales con remplazo hormonal, este fenómeno electrofisiológico coincide con el día de la ejecución de la conducta sexual. No obstante que vamos a analizar este punto ampliamente en la sección de discusión de esta tesis, estos resultados sugieren que la aplicación de P para inducir la fase de *estro-proestro* en la rata hembra necesario para la ejecución de la conducta sexual, pueden modular positivamente al receptor GABA_A, lo cual puede explicar la disminución del número de complejos espiga-onda durante el primer día de la abstinencia (figura 15 A).

Como previamente ya se había identificado en esta tesis, el hemisferio contralateral tiene una propagación de la actividad epileptiforme de la abstinencia (figura 13). Los animales del grupo SAG-OVX+E/P presentaron un perfil de hiperexcitabilidad cortical en el hemisferio contralateral en cuanto al incremento del número de complejos espiga-onda comparado con el hemisferio infundido. De esta manera, la descripción de los datos de la evolución temporal del SAG indica que durante la inducción de la abstinencia, en el hemisferio contralateral se cuantificaron 1090 ± 130 complejos espiga-onda (figura 12 B, triángulos invertidos azul oscuro; $p \leq 0.001$); esta hiperexcitabilidad neuronal disminuye 24 h después de la inducción (37 ± 4 complejos espiga-onda; F; 4, 25; $=23.06$, $p \leq 0.001$), en analogía con el hemisferio instilado el número de espigas epilepticas aumentó a 70 ± 12 el segundo día después de la inducción del SAG. Asimismo, al tercer día de evolución de la abstinencia, el número de complejos epileptiformes fue de 32 ± 6 ($p \leq 0.001$). En contraste, los animales SAG-OVX tuvieron incremento del número de complejos espiga-onda el día de la inducción (350 ± 10 ; $p \leq 0.001$) el cuál se mantiene 3 días después haber iniciado el SAG (360 ± 40 ; 320 ± 70 ; 360 ± 110 ; *días 1, 2 y 3* respectivamente; cuadros; $p \leq 0.01$).

9.5 **Correlación del incremento de la potencia asociado al incremento de los complejos espiga-onda durante el SAG**

Esta tesis muestra por primera vez la relación proporcional entre el porcentaje de incremento de la potencia y la frecuencia de las descargas paroxísticas del EEG en la rata hembra: a mayor número de eventos espiga-onda existe un mayor incremento en la potencia del registro EEG (figura 16). Los resultados del análisis de correlación que se realizó entre el porcentaje de aumento de la potencia y el porcentaje de aumento de los complejos espiga-onda, indicaron una correlación positiva ($\rho=0.73$) entre ambas variables. Esto sugiere que la hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia al GABA tiene un correlato estrecho, entre la potencia del EEG y la descarga epileptiforme.

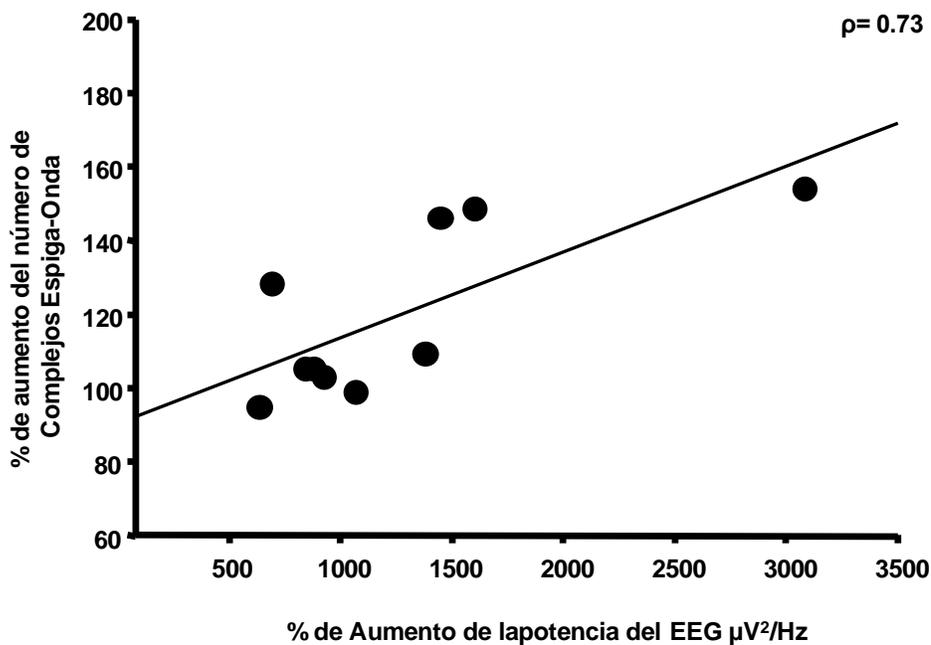


Figura 16. La potencia y la actividad epileptiforme del SAG tienen una relación lineal. Los complejos espiga-onda se relacionan directamente con el aumento en la potencia del EEG en el SAG. Se muestra la correlación positiva de Pearson ($\rho = 0.73$) demostrando que ambos fenómenos se encuentran asociados: a mayor número de complejos espiga-onda mayor es la potencia del EEG.

9.6 ***Aumento de la Conducta Sexual en el Estadio Inicial del SAG***

La conducta sexual de la rata hembra es una conducta motivada que conlleva una respuesta refleja, la cual se presenta únicamente en la fase de estro-proestro del ciclo reproductivo de estos animales; por lo tanto en los animales OVX, es necesaria la administración secuenciada de hormonas sexuales (E y P). Para evaluar la conducta sexual de la rata hembra, se le coloca junto a un macho sexualmente experto y se cuantifican: 1) Número de lordosis realizadas durante la prueba (máximo 10) y 2) Cociente de lordosis (número de montas/número de lordosis x 100).

En el planteamiento de esta tesis propusimos que la disminución del tono GABAérgico por la abstinencia a GABA, incrementaría la conducta sexual de la rata hembra

Los animales ovariectomizados sin remplazo hormonal (SAG-OVX), no se incluyeron en la evaluación de esta prueba debido a que, al no tener hormonas sexuales, no pueden realizar la conducta sexual.

El número promedio de lordosis realizadas por todos los animales experimentales fue de 10 en un periodo promedio de 5-6 min (figura 17 A) por lo que no existen diferencias significativas en cuanto a la ejecución motora de la prueba puesto que todas las ratas realizaron las 10 lordosis. Es decir, el SAG no modificó la actividad motora de los animales.

El cociente de lordosis de las ratas CTL-OVX+E/P (N=9), fue de 100%, (F; 2, 21; =674.62, $p \leq 0.05$; barras blancas; figura 17 B) Por lo tanto se tomó como parámetro para evaluar los efectos de las manipulaciones experimentales.

La actividad sexual de las ratas hembra con cirugía estereotáxica pero sin SAG (SHAM-OVX+E/P; N=6) no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control descrito anteriormente. El cociente de lordosis fue de $98 \pm 2\%$ ($p \leq 0.05$; barras azul claro; figura 17 B).

A los animales SAG-OVX+E/P; (N=9), se les cuantificó un cociente de lordosis de $135 \pm 2\%$ ($p \leq 0.001$) el cual fue significativamente mayor que el obtenido en los grupos control. Lo anterior demuestra que la conducta sexual durante la abstinencia a GABA se incrementó un 35%.

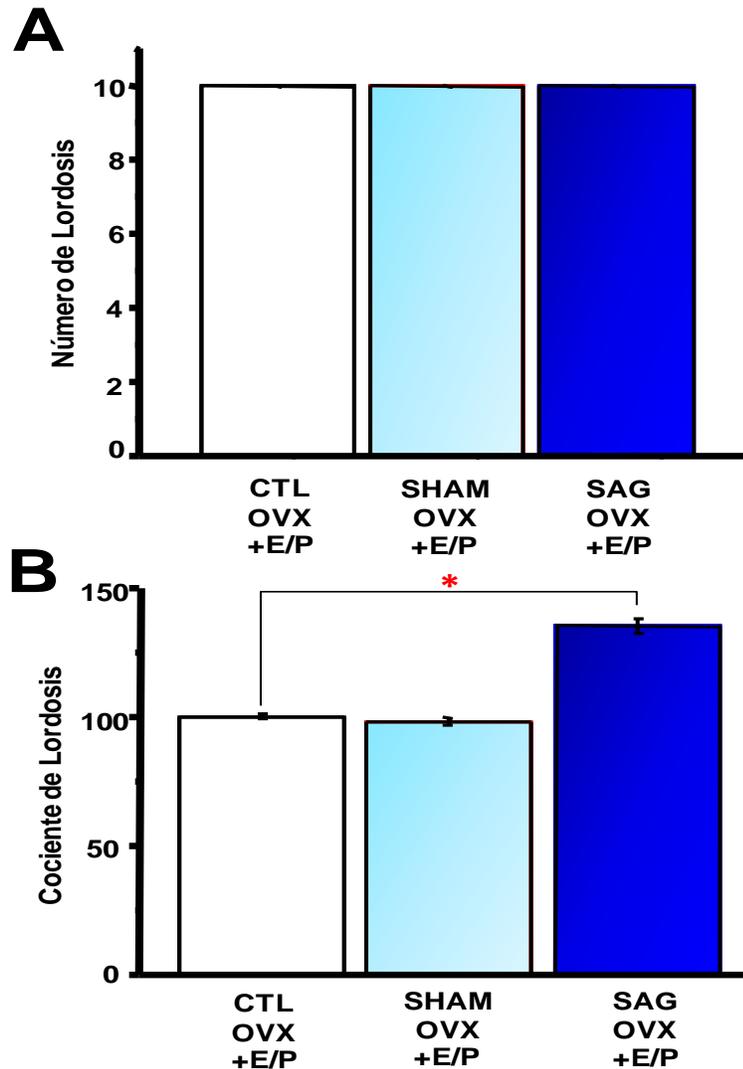


Figura 17. El SAG aumenta la conducta sexual de la rata hembra. En A se muestra el número de lordosis realizado por los animales en presencia de un macho sexualmente experto, la dispersión es nula debido a que todos los animales presentaron la conducta lordótica, es decir, las hembras OVX fueron sexualmente receptivas. En B se grafica el cociente de lordosis (número de montas/ número de lordosis x 100) el cual aumentó significativamente en un 35% durante el SAG, grupo **SAG-OVX+E/P**, (N=9; barras azul oscuro). **CONTROL-OVX+E/P** (N=9; barras blancas) y **SHAM-OVX+E/P**, (N=5; barras azul claro). La barras representan el promedio de lordosis y cociente de lordosis, respectivamente \pm E.E. ANOVA *post-hoc* Dunette (* $p \leq 0.05$).

9.7 Medición de la Ansiedad en el Estado Inicial del SAG

El LEC es una prueba cuantitativa para la medición de la ansiedad en roedores, en la presente tesis se utilizó para evaluar con detalle la conducta de ansiedad que acompaña a la abstinencia a GABA en su estado inicial. Se midió el tiempo de permanencia que tuvo el animal en los BC y los BA; así como, el porcentaje del tiempo de permanencia en cada uno de estos brazos.

El objetivo en esta parte de la tesis fue determinar si, como lo propusimos, la abstinencia a GABA en el cerebro de la rata hembra genera ansiedad, además de identificar si la ovariectomía influía en el perfil ansiogénico que caracteriza a la abstinencia.

Los resultados indicaron que los animales del grupo CTL-OVX+E/P (N=9) tuvieron un mayor número de entradas a los BC (6.5 ± 0.9 , figura 18 C; barras blancas) en relación al número de entradas a los BA (2.7 ± 0.3); en cuanto al porcentaje de tiempo de permanencia en cada uno de los brazos, para los BC se encontró un $82 \pm 2\%$ el cual es mayor que en los BA de $21 \pm 3\%$ (figura 18 B y D; barras blancas); es decir, el grupo control tuvo una tendencia a presentar un estado de ansiedad.

El grupo de animales SHAM-OVX+E/P (animales con ovariectomía y cirugía estereotáxica sin manipulación farmacológica), tuvo un perfil semejante al grupo de animales control (barras azul claro, figura 18 A-D). Este resultado indica que la cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas/ electrodos no indujo cambios en el perfil de ansiedad de las ratas.

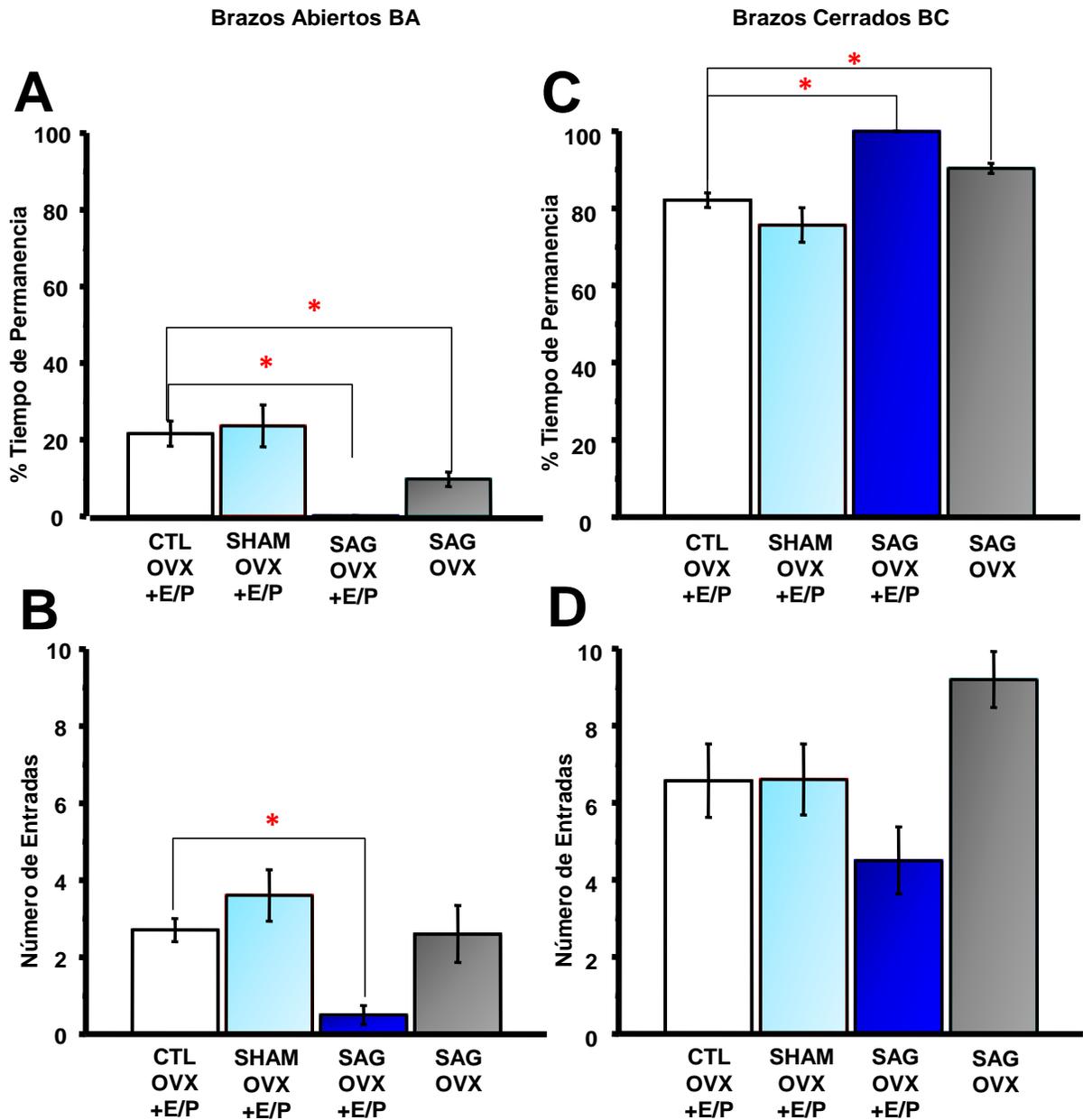


Figura 18. El SAG induce ansiedad en la rata hembra ovariectomizada. Análisis de la prueba conductual de laberinto elevado en cruz (LEC). La ansiedad se mide si el animal permanece mayor tiempo en los brazos cerrados (BC) asociado a una disminución de permanencia en los brazos abiertos (BA). En **A** se graficó el porcentaje de tiempo de permanencia en BA; en **B** el número de entradas a los BA; en **C** se graficó el porcentaje de tiempo de permanencia en BC y en **D** se observa el número de entradas en los BC. Los grupos **CTL-OVX+EP** (N=9; barras blancas) y **SHAM-OVX+E/P** (N=5; barras azul claro) no muestran diferencias en su perfil conductual; en contraste, los grupos **SAG-OVX+E/P** (N=9; barras azul oscuro) y **SAG-OVX+E/P** (N=6; barras grises) presentan ansiedad cuantificada por el aumento en el tiempo de permanencia en los BC. Promedio del porcentaje de tiempo y del número de entradas a cada brazo \pm E.E. ANOVA *post-hoc* Dunette (* $p \leq 0.05$).

En contraste con lo identificado en los grupos anteriores, el grupo de animales SAG-OVX+E/P, presentó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de tiempo de permanencia en los BA, el cual se ve reducido con respecto al grupo control (0.12 ± 0.7 ; F; 3, 25; $=15.58$, $p \leq 0.01$; barras azul oscuro, figura 18 B), el porcentaje del tiempo de permanencia en los BC se incrementó significativamente (99.8 ± 0.07 ; F; 3, 25; $=24.25$, $p \leq 0.01$); esto sugiere un perfil de ansiedad en los animales con SAG. Aunado a esto, el número de entradas a BA disminuyó significativamente (0.5 ± 0.25 ; F; 3, 25; $=8.68$, $p \leq 0.01$). No obstante, el número de entradas hacia los BC no mostraron diferencias significativas cuando se compararon con el grupo control.

Finalmente, el análisis del grupo de animales OVX sin tratamiento hormonal con SAG, evidenció un perfil semejante al que tuvo el grupo de los animales con hormonas: aumento en el tiempo de permanencia en los BC ($90 \pm 6\%$; $p \leq 0.05$) y disminuyó en el porcentaje del tiempo de permanencia en los BA (9 ± 6 ; $p \leq 0.05$, figura 18 A y C, barras grises). El número de entradas a los BA y los BC no se vio afectado por la abstinencia (figura 18 B y D, barras grises). Estos datos indican que los animales SAG-OVX presentaron un perfil de conducta ansiosa, similar al de los animales con remplazo hormonal (E/P).

9.8 *Medición de la conducta depresiva durante el SAG*

La última medición conductual de los animales experimentales fue la evaluación del perfil depresivo a través de la prueba de nado forzado (NF). Los animales con SAG o del grupo control fueron colocados en un cilindro con agua a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, en estas condiciones realizaron tres conductas distintas: trepar, nadar o quedarse inmóviles. La identificación de un estado semejante a la depresión en esta prueba conductual está indicado porque los animales disminuyen las conductas de trepado o nado (conductas activas) e incrementan la conducta de inmovilidad (conducta pasiva). Nosotros planteamos que la abstinencia a GABA induciría un perfil depresivo en los animales.

Los animales del grupo CTL-OVX+E/P (figura 19 A-C; barras blancas; N=9) ejecutaron la conducta de nado un promedio de 1.7 ± 0.7 eventos/5 min, en tanto que el número de ocasiones de la conducta de trepado fue de 25 ± 1 eventos/5 min. El número de veces que realizaron la conducta de inmovilidad fue de 32 ± 1.7 eventos/ 5 min. El grupo SHAM-OVX+E/P; (figura 19 A-C; barras azul claro; N=6) no mostró diferencias significativas con el grupo control en ninguna de las tres conductas previamente mencionadas (2 ± 0.3 nado; 24 ± 4.5 trepado; 33 ± 4 inmovilidad). En contraste, en el grupo de los animales SAG-OVX+E/P se cuantificaron diferencias significativas, en este grupo se identificó una disminución en la actividad de trepado (8 ± 1.4 eventos/5 min; F; 3, 25; $=13.89$, $p \leq 0.05$) y aumento de la conducta de inmovilidad (49.7 ± 1.5 eventos/5 min; figura 19 A-C; barras azul oscuro; N=9, F; 3, 25; $=14.38$, $p \leq 0.05$).

El grupo de animales SAG-OVX (figura 19 A-C; barras grises; N=6) mostró una disminución significativa en la conducta de trepado (15.8 ± 1.7 eventos/5 min; $p \leq 0.01$) y una mayor ejecución en la conducta de inmovilidad (42.1 ± 1.7 eventos/5 min; $p \leq 0.01$), es decir, que en animales OVX el SAG, también indujo un perfil depresivo. Tanto en el grupo con remplazo hormonal, como en el que no lo tuvo, la conducta de nado no presentó diferencias significativas en relación al grupo control.

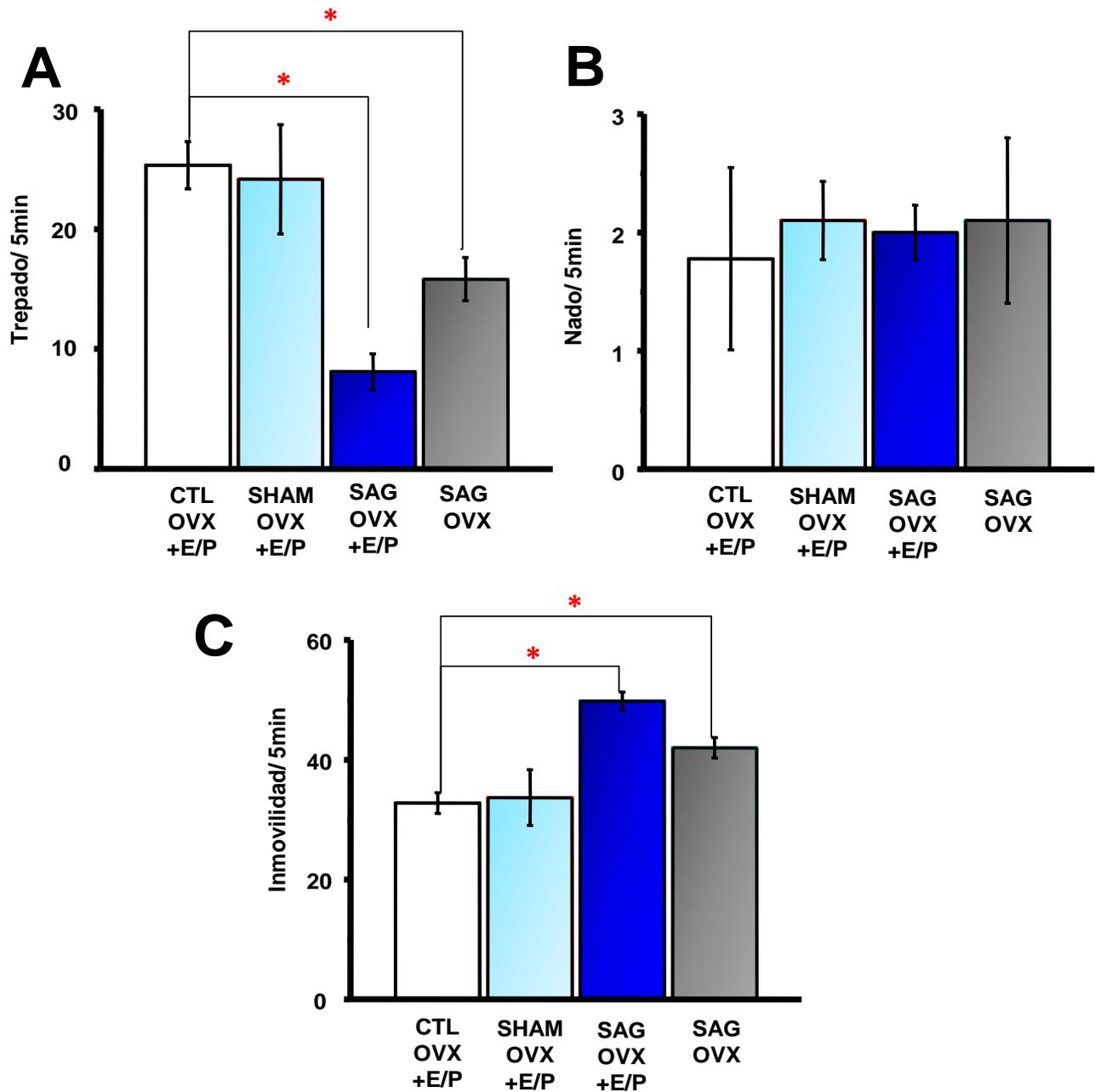


Figura 19. El SAG induce un perfil depresivo en la rata hembra OVX. Análisis del paradigma conductual de nado forzado (NF). Ejecución promedio de trepado en **A**, gráfica de nado en **B**, e inmovilidad en **C**. Un aumento en la incidencia de la inmovilidad (conducta pasiva) y la disminución de la conducta de trepado (conducta activa) son un indicador de un perfil depresivo. En los grupos con el SAG hay un aumento en la conducta de inmovilidad y una disminución en la actividad de trepado (**SAG-OVX+E/P**; N=9; barras azul oscuro; **SAG-OVX**; N=6; barras grises). En contraste, los grupos **CONTROL-OVX+E/P** (N=9; barras blancas) y **SHAM-OVX+E/P** (N=6; barras azul claro) no presentan un perfil depresivo. Se grafica el promedio de las conductas en 5 min \pm E.E. ANOVA *post-hoc* Dunette (* $p \leq 0.05$).

10 DISCUSIÓN

Generalidades

Los resultados de la presente tesis muestran que la abstinencia aguda a GABA en la rata hembra genera cambios EEG y conductuales. Se identificó un aumento de la actividad cortical en la región de infusión del neurotransmisor caracterizado por la aparición de complejos espiga-onda de alta frecuencia y de gran amplitud que se redujo progresivamente después de la inducción de la abstinencia (5 días). El remplazo hormonal de E/P, tiene un efecto importante en los mecanismos de inducción del SAG en la rata hembra, ya que la amplitud de la actividad epileptiforme es mayor en animales con una administración de hormonas. Durante los primeros estadios de la abstinencia, cuantificamos que los animales tienen una conducta de ansiedad. Con un aumento de la actividad sexual, asociado un incremento en la inmovilidad y reducción de las conductas activas en la prueba de nado forzado que son indicadores de la presencia de un perfil depresivo.

Análisis espectral de Wavelets durante el SAG

No obstante que el análisis en el 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 hiperexcitabilidad neuronal 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 esta tesis se utilizó el análisis de frecuencia de Wavelets.

La teoría numérica que analiza eficientemente eventos estocásticos es el análisis de Wavelets y que puede describir espectralmente un fenómeno eléctrico, sin importar sus características estadísticas. Este método representa a la mejor herramienta matemática para el análisis espectral de eventos estacionarios y transitorios. Un incremento en la actividad (amplitud) lo transforma en colores cálidos (rojo-naranja) y en contraparte su reducción se cuantifica con colores fríos (verde-azul).

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.

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 μ l/h/2h), 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 de la primera espiga entre ratas hembra ovariectomizadas con remplazo hormonal E/P y OVX sin administración de hormonas no tiene diferencias entre ellas (15 min), con duración de 5 días (figuras 10 y 11). Las discrepancias que existen con los datos anteriormente reportados 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, lo cual concuerda con el hecho de que la zona de lesión cerebral es mayor en los grupos aquí instilados 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 disminuyen la síntesis y 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 et al., 1994). En el componente postsináptico hay una disminución en el número de receptores GABA_A asociado a cambios en expresión de subunidades del receptor ionotrópico, como lo son los cambios en la expresión de la subunidad α que reducen significativamente la sensibilidad farmacológica del receptor (Brailowsky et al., 1988; Will, Toniolo y Brailowsky, 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 a la 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 Ca²⁺ tipo L. Si bien la ventana temporal de los sucesos sináptico-moleculares son difíciles de indicar, nuestra línea investigación muestra que las primeras 24 h el evento depende exclusivamente de los cambios de la neurotransmisión GABAérgica (Araneda et al., 1994).

En otros modelos de abstinencia como el inducido por el clonazepam, se ha identificado que las neuronas de la corteza somatomotora hay un incremento en su actividad dependiente de una disminución de la actividad de los receptores muscarínicos, un incremento en la activación de receptores nicotínicos, asociado a una disminución de la corriente saliente de K⁺, un incremento de la expresión de la enzima acetilcolinesterasa, así como, un aumento del consumo de glucosa.

Nosotros identificamos que, contrario a lo inducido por el GABA, en la corteza que sólo fue instilada con el vehículo (solución salina) no se modifica en el EEG la potencia, frecuencia o amplitud, por lo tanto queda de manifiesto que este modelo es a expensas de las modificaciones de la concentración del neurotransmisor en el espacio sináptico y los consecuentes cambios a nivel pre y postsináptico como previamente se ha demostrado en diversos trabajos (Silva-Barrat et al., 2005; Silva-Barrat et al., 2001; Silva-Barrat et al., 1995; Araneda et al., 1994; Menini et al., 1991).

Relación entre la potencia y el número de eventos espiga-onda durante 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 hembra al cual se le interrumpió la instilación exógena de GABA. El análisis de Wavelets indica que la hiperexcitabilidad neuronal máxima se encuentra en un espectro de potencia entre 3-17 Hz (figura 9). Esta es la primera vez que se realiza un SAG en la rata hembra con un análisis de esta magnitud. Además, se analizó el hemisferio contralateral y a través de esta cuantificación se identificó que durante el SAG se propaga la actividad epileptiforme en donde: **1)** el día de la inducción, el número de complejos espiga-onda es semejante a los presentes en la corteza somatomotora instilada (derecha; figura 11). No obstante que el hemisferio instilado tiene una gran actividad, la evolución temporal de la abstinencia muestra que la hiperexcitabilidad en el hemisferio contralateral es menor y **2)** el aumento de la potencia del EEG tiene una relación proporcional con la presencia del número de complejos espiga-onda durante el SAG (figura 16), como lo propuso Brailowsky et al., (1988) la actividad del SAG es una actividad epileptiforme de gran amplitud en sus estadios iniciales.

Es importante mencionar que en el primer día después de la abstinencia (*día 1*) en los animales con remplazo hormonal, se presenta una disminución significativa, tanto en la potencia del EEG como en el número de complejos

espiga-onda, esto puede deberse a la aplicación de P que tiene lugar para inducir/evaluar a la conducta sexual.

Datos recientes de nuestro laboratorio muestran algunas diferencias significativas entre el SAG de la rata de hembra con respecto al de la rata macho: la potencia del EEG en estadios iniciales del SAG es mayor en la rata hembra, sin embargo, su duración es menor comparado con el SAG de las ratas macho (Pimentel, 2013).

Efecto de la ovariectomía durante el estado inicial del SAG

La potencia del EEG durante la inducción del SAG en el grupo de animales OVX que recibieron las hormonas sexuales (E/P) mostró una diferencia significativa en relación a los animales sin remplazo hormonal. Un análisis cualitativo en el espectro de color que traduce la potencia del EEG indica que el SAG de animales OVX con E/P tienen mayor actividad en el espectro de color rojo que corresponde a una frecuencia entre 3-17Hz; el cual contrasta con los animales con SAG OVX sin remplazo hormonal que refiere un EEG cuya actividad se encuentra entre los 3-15Hz, pero una menor potencia (colores azul-verde; figura 12).

Este incremento en la actividad neuronal del SAG por el remplazo hormonal se debe al efecto de los estrógenos en la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica. El 17β -estradiol es un antagonista del receptor $GABA_A$ e incrementa la actividad de los receptores NMDA. Es decir, un día antes de la inducción del SAG la administración de estrógenos genera un efecto potenciador de la abstinencia. En la fenomenología de la inducción de la abstinencia a GABA, nosotros proponemos que la administración de un esteroide que incrementa las propiedades excitables de la membrana neuronal, generen una mayor potencia de las descargas epileptiformes al inicio del SAG. Éste fenómeno seguramente se modifica por la administración consecuente de P, su administración se realizó un día después de la inducción del SAG y debido a que la P es un modulador alostérico positivo del receptor $GABA_A$, la administración de este neuroesteroide

durante el SAG redujo sus manifestaciones electrofisiológicas. Datos clínicos que apoyan la descripción de este evento es la epilepsia catamenial en la cual las crisis convulsivas se exacerban en la etapa estrogénica y después de la ovulación, durante la etapa progestacional, la probabilidad de padecer una crisis epiléptica se reduce significativamente. Por lo tanto, mientras que los estrógenos incrementan la excitabilidad neuronal, la P la disminuye (Redy, Kim y Rogawsky, 2001; Penell, 2009, Veliskova, 2006; Majewska et al., 1986).

Se ha identificado que la administración de estrógenos incrementa la liberación de GABA en hipocampo (Veliskova, 2006), este fenómeno depende de la dosis de la hormona esteroide. Esta tesis tiene la particularidad de haber experimentado la administración de estrógenos en forma previa a la instilación de GABA intracortical, nosotros proponemos que esta estrategia farmacológica incrementa aún más los mecanismos inductores de la abstinencia al generar un aumento de GABA endógeno, el cual se ve favorecido con la instilación intracortical exógena, lo cual potencia la desensibilización y reducción de los receptores GABA_A asociado a una disminución en la síntesis de GABA, así como un incremento en la actividad glutamatérgica que desencadena aún más la hiperexcitabilidad.

El SAG incrementa la Conducta Sexual en la rata hembra

Trabajos experimentales previos a esta tesis muestran que los esteroides sexuales inducen o modifican la respuesta sexual en los roedores, modulando la actividad de diversas regiones del cerebro para la expresión de la conducta sexual. Las estructuras mesolímbicas (VTA, NAc, POA y Cx prefrontal) son las responsables del inicio y el mantenimiento de la conducta sexual. En este contexto las interacciones sinápticas de la actividad a GABAérgica son de suma importancia en la conexión de circuitos de interconexión en las áreas límbicas, lo cual ayuda a reforzar o inhibir los procesos de reforzamiento de conductas como en el caso de las adicciones, los procesos hedónicos o las conductas relacionadas a la reproducción. Es decir que la actividad de los esteroides sexuales es

fundamental para la aparición de estrategias neuronales relacionadas con el proceso sexual (King, 2008; Hull y Domínguez, 2007).

En la rata hembra la conducta sexual depende de la activación principalmente de dos estructuras el VTA y el VMH. La línea de investigación de Frye (2001) ha identificado que la neurotransmisión GABAérgica es fundamental en ambos núcleos para la expresión de la lordosis. Sin embargo, la modulación que tienen los neuroesteroides pregnanos reducidos en ambos núcleos es diferente en los mecanismos que inducen la conducta sexual. La P y sus metabolitos reducidos tienen una actividad no genómica en el VTA (latencia y duración corta modulando directamente al receptor GABA_A) en contraste con la modulación que tiene en el VMH que lo hace a través de una inducción genómica (activación de receptores intracelulares y modificación de la expresión genética de la neurona, por lo tanto su latencia y duración de estos efectos es en el orden de, horas, días).

Los estrógenos inducen la expresión de receptores intracelulares para P, tanto en el cerebro como en cualquier órgano en el que la P tenga actividad. Los estrógenos a nivel cerebral también cambian la actividad sináptica como anteriormente ya hemos descrito, incrementa la liberación de GABA, pero además, también lo hacen en la liberación de dopamina, glutamato, adrenalina y serotonina (Frye y Edinger, 2004). En consecuencia los estrógenos también modifican diversas conductas. En el caso de la conducta sexual, es necesaria la co-liberación secuenciada de E previa a la de P, sin este evento, la conducta sexual de lordosis no se expresa por la rata hembra.

La actividad de los esteroides sobre la modulación de la conducta sexual es a tres niveles: 1) modificando la liberación de diversos neurotransmisores, 2) a través de interacción con sus receptores intracelulares (latencia duraciones largas) y 3) modulando la excitabilidad neuronal mediante su acción en los receptores de algunos neurotransmisores como el GABA, el glutamato, la dopamina y la serotonina (duración corta).

En términos generales, un incremento en la conducta sexual de la rata hembra, es reflejado en el número o cociente de lordosis durante el tiempo invertido en una serie copulatoria. Los datos de la figura 17 muestra claramente que los animales con el SAG y remplazo E/P tienen un incremento en el cociente de lordosis estadísticamente significativo con respecto al grupo control. No obstante a que el número lordosis no se modificaron entre ambos grupos.

El aumento en la conducta sexual durante la abstinencia a GABA indica claramente que los estrógenos tienen un papel fundamental en este evento. Es conocido que los E modulan positivamente la neurotransmisión glutamatérgica en estructuras límbicas y corticales; en consecuencia, este proceso puede modificar positivamente la actividad sexual.

El SAG en su etapa inicial se caracteriza por un cambio en el número de receptores activos y una disminución significativa en la síntesis y liberación de GABA en la zona de hiperexcitabilidad neuronal (Calixto et. al., 2001; Casasola et al., 2004). Nosotros proponemos que este cambio en la neurotransmisión GABAérgica modifica la conducta sexual, ya que al disminuir el número de receptores, la reducción del tono GABAérgico modifica la liberación de dopamina y noradrenalina en estructuras límbicas y corticales, en consecuencia este proceso puede modificar positivamente la actividad sexual incrementando el poder reforzador de los estímulos que promueven la actividad sexual en la rata hembra.

La actividad GABAérgica tiene un papel fundamental en la generación de la conducta de lordosis en las ratas hembra en núcleos fundamentales para su ejecución (Frye, 2001), la aplicación de agonistas y antagonistas del receptor GABA_A en estructuras límbicas no modifica el comportamiento sexual de la rata hembra (Fernández- Guasti et al., 1986). Al respecto de este punto, datos recientes de nuestra línea de investigación indican que durante la abstinencia a Dz en ratas hembra (Cornejo, 2011), la conducta sexual se incrementa. Estos antecedentes comparados con los resultados de esta tesis indican que la modificación de la actividad GABAérgica está directamente relacionada con la

conducta sexual de la rata hembra, en otras palabras, el SAG tiene un efecto potenciador de la conducta sexual aumentando el cociente de lordosis sin modificar el número de lordosis, a diferencia de lo que se presentan en la rata macho: el SAG disminuye la conducta sexual (Pimentel, 2013). Nosotros proponemos que el SAG tiene diferencias conductuales entre la rata macho y la hembra.

Los neurotransmisores que promueven la conducta sexual de la rata hembra son dopamina, NE, Ach y GABA mientras que la 5-HT inhibe la conducta (Justel, Bentosela y Mustaca, 2009; Fernández-Guasti y López-Ruvalcava, 1997). Además, la concentración plasmática de P y E, tienen una relación directa de las gónadas y el sistema nervioso central, la secuencia de liberación de estas hormonas está involucrada tanto en las conductas del inicio, como de búsqueda (proceptivas) y de ejecución (receptivas).

El SAG induce hiperexcitabilidad neuronal, este es un tipo de epilepsia parcial ya que solo se manifiesta en la zona de instilación (Brailowsky et al., 1989; Calixto et al., 2001). Los datos de esta tesis muestran un aumento del cociente de lordosis que puede indicar un incremento en la motivación para ejecutar la conducta sexual. Nuestra propuesta es que esto puede ser debido a que el SAG cortical: 1) modifica la actividad de áreas límbicas mediante un proceso de propagación de la hiperexcitabilidad neuronal y 2) un incremento en la actividad de áreas corticales involucradas en el circuito de motivación que son fundamentales en la conducta sexual; sin embargo, futuros trabajos de nuestro laboratorio deben estar orientados a identificar específicamente, la relación entre el SAG y el área específica involucrada en el incremento de esta conducta.

El SAG induce un estado de ansiedad en la rata hembra

La ansiedad se caracteriza por una activación del sistema nervioso autónomo, permite el incremento del metabolismo, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria disminución en la atención, asociado a un incremento de la sensibilidad sensorio-perceptiva. La conducta de ansiedad aparece como un fenómeno de adaptación ante un estímulo amenazante para los organismos, pero también puede ser el resultado de cambios en la plasticidad neuronal durante los primeros estadios de síndromes de abstinencia a diferentes drogas. El estudio de la ansiedad actualmente en el campo de las neurociencias puede estimarse por el incremento de la actividad cortical en mamíferos, aparece en el EEG una actividad de disminución en la potencia asociada a un incremento en la frecuencia de la actividad basal. Es decir un incremento en la actividad cerebral. Las estructuras cerebrales relacionadas con la generación y expresión de la conducta ansiosa son: la amígdala cerebral, el hipocampo y la Cx prefrontal (Möhler, 2012; Clement y Chapouthier, 1997).

La ansiedad es uno de los componentes de muchos síndromes y psicopatologías relacionados a cambios en la neurotransmisión GABAérgica, glutamatérgica, serotoninérgica y noradrenérgica (Martín-García et al., 2007; Czlonkowska et al., 2003; Clement y Chapouthier, 1997).

El LEC es un instrumento cuantitativo de medición conductual en el cual se puede medir objetivamente la manifestación de la ansiedad de roedores, esta herramienta es confiable y reproducible en la obtención de resultados (Rodgers et al., 1997). La cuantificación del efecto ansiolítico de los fármacos a través de este instrumento ha sido previamente validada (Pellow et al., 1985). Los fármacos con propiedades ansiolíticas, como las benzodiazepinas, son comúnmente agonistas o moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A. Dado que el SAG es una analogía a lo que sucede al retirar drogas que modulan al receptor GABA_A, en esta tesis planteamos que la disminución del tono GABAérgico que genera el SAG tiene como consecuencia la aparición de ansiedad en los primeros estadios.

En la figura 18 de esta tesis, se muestran el análisis de los resultados de la medición de la ansiedad en los grupos de animales con SAG OVX con y sin remplazo hormonal. No obstante que los animales sin remplazo hormonal tienen una tendencia a permanecer menos en los BC, esta diferencia no fue significativa con el grupo que recibió hormonas sexuales. Es decir, una de las características conductuales del SAG en la rata hembra OVX es la inducción de ansiedad.

Datos recientes de nuestro laboratorio, confirman que la aparición compleja espiga-onda en el EEG (hiperexcitabilidad cortical) se acompañan de un perfil de ansiedad generados por la abstinencia a Dz (Cornejo, 2011). Es decir, la disminución de la actividad GABAérgica es capaz de poner de manifiesto conductas ansiosas (Picazo et al., 2006; Fernández-Guasti y Picazo, 1999). Asimismo, en la rata macho (Pimentel, 2013), el SAG también induce un perfil significativo de ansiedad, el cual es semejante en animales gonadectomizados. Lo anterior confirma que en la rata, independientemente de su sexo, una gonadectomía, no modifica la capacidad de inducir ansiedad durante un SAG.

La OVX disminuye la concentración de los niveles de E y P, estudios previos han demostrado que este estado induce por sí sólo la aparición de ansiedad. En este contexto, la aplicación de P o sus metabolitos reducidos, disminuye la manifestación de la conducta ansiosa (Cornejo, 2011; Frye y Edinger, 2004; Picazo et al., 2006).

De esta manera, la aparición de la ansiedad tiene un correlato con la disminución de la actividad GABAérgica. Nuestros datos indican claramente una relación inversa entre la conducta de ansiedad y el estado de disminución del sistema de la inhibición dependiente del GABA. Esta es la primera evidencia en la cual el correlato electrofisiológico de hiperexcitabilidad neuronal que caracteriza al SAG se asocia a una modificación conductual en la rata hembra.

Efecto del SAG en la conducta tipo-depresiva

Se ha documentado previamente que una disminución en los niveles de GABA está relacionado con la expresión de síntomas depresivos: irritabilidad, anhedonia, y melancolía (Petty et al., 1982; Paredes, 1991; Möhler, 2012). En el campo de las neurociencias se ha identificado 1) que los E, son ansiogénicos y 2) que la P, es ansiolítica. Un ejemplo de esta relación es: a) la abstinencia a P en roedores se asocia a conductas depresivas (Yan Li, 2012) b) existen evidencias clínicas que indican que la depresión postparto y el síndrome premenstrual se inducen tras una disminución abrupta de la concentración plasmática de P. Lo anterior indica, que la expresión de la depresión también tiene un proceso relacionado con la neurotransmisión GABAérgica y la abstinencia a moléculas que modulan a su receptor GABA_A (Zorumsky, 2013).

Un modelo animal altamente utilizado y reproducible que nos permiten evaluar un estado tipo depresivo es la prueba de NF, mediante ella se ha evaluado el efecto de fármacos antidepresivos, en este paradigma se examinan tres conductas básicas, las primeras dos son consideradas activas (nado y trepado) y la tercera es pasiva (inmovilidad). Mediante el uso de esta prueba se puede identificar la presencia de un perfil tipo-depresivo; cuando los animales tienen un incremento en la conducta de inmovilidad y una reducción de las conductas de nado o trepado (Porsolt et al., 1998; Dekte y Lucki, 1996; Nishimura et al., 1987).

En esta tesis identificamos en la prueba de NF que las ratas hembra SAG-OVX y SAG-OVX+E/P presentan la conducta de inmovilidad con mayor frecuencia que las ratas hembra control, por lo que afirmamos, que el SAG induce la aparición de conductas de inmovilidad (depresivas; figura 19).

Estudios previos muestran que las ratas hembra y macho responden diferencialmente a los antidepresivos, en los machos los antidepresivos tricíclicos tienen un mejor efecto; en cambio las hembras mejoran con la administración de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. En las hembras, las hormonas esteroides (E y P) tienen potentes efectos antidepresivos; en los

machos, los andrógenos producen similares acciones antidepresivas evaluadas en la prueba de NF (Dekte y Lucki, 1996; Frye, 2011; Kokras et al., 2012; Martínez-Mota y Fernández Guasti, 2003; Martínez-Mota et al., 2011; 2008). Nuestros resultados muestran que, independientemente de la administración de sustitución hormonal, la hiperexcitabilidad neuronal del SAG de la rata hembra se asocia con la presencia de las conductas depresivas, sin modificaciones en la conducta de nado, lo cual indica que el animal no tiene un impedimento motor secundario por la manipulación de GABA en la corteza cerebral. Datos recientes de nuestro laboratorio muestran que el SAG en ratas macho con y sin gonadectomía induce un incremento en la conducta de trepado, es decir, que el SAG en machos incrementa la movilidad (Pimentel, 2013). En resumen, la conducta de inmovilidad de la rata hembra no es debida a una alteración motora, nosotros proponemos que se debe a una modificación de la neurotransmisión GABAérgica inicialmente y eventualmente a cambios en otras neurotransmisiones en estadios tardíos.

Evidencias recientes (Kiersten, 2012) han identificado que la subunidad $\alpha 2$ del receptor GABA_A participa en el efecto antidepresivo de algunos fármacos. Así mismo en ratones knockout sin expresión de esta subunidad manifiestan conductas depresivas evaluadas en el NF. Una de las características moleculares de las abstinencias son los cambios en la expresión de las subunidades, por ejemplo la abstinencia a etanol y de alopregnanolona hay una reducción de la expresión de la subunidad $\alpha 1$ y un incremento de la $\alpha 4$ lo cual cambia la sensibilidad farmacológica del receptor (Smith et al., 2007). Nosotros proponemos que durante el SAG también existen modificaciones de las subunidades de los receptores, experimentos preliminares de biología molecular de nuestro laboratorio de investigación apoyan la propuesta de que cambios en la subunidad $\alpha 1$ y $\alpha 2$ suceden en los estadios iniciales del SAG.

Esta tesis cumplió en su totalidad su objetivo experimental el cual fue identificar las modificaciones electrofisiológicas asociadas a cambios conductuales que subyacen a la abstinencia a GABA en la rata hembra, evaluando el impacto

de la abstinencia en la inducción de la conducta sexual y midiendo la conducta de ansiedad y la conducta depresiva durante las fases tempranas del SAG.

Planteamos cuatro hipótesis de trabajo las cuales fueron aceptadas. 1) Demostramos que el SAG en la rata hembra: genera cambios a nivel EEG que se cuantifican por la aparición de complejos espiga-onda y un aumento de la potencia estos cambios se asocian conductualmente a: 2) un aumento en la conducta sexual, 3) inducción de conducta asociada a la ansiedad, y 4) favorecen la aparición de conducta depresiva en los animales.

11 CONCLUSIONES

1. El SAG en la rata hembra se identifica por un incremento de la actividad del EEG: con latencia de 15 min y duración de 5 días cuya característica fundamental es un incremento en la potencia y aparición de complejos espiga-onda.
2. El SAG expresa mayor actividad electrofisiológica en las ratas hembra OVX con remplazo hormonal.
3. Durante el SAG en la rata hembra OVX sin remplazo hormonal y OVX con administración de hormonas, se observa un incremento en las conductas asociadas a la ansiedad.
4. El SAG aumenta la conducta sexual de la rata hembra.
5. El SAG en la rata hembra favorece la aparición de conductas asociadas a un estado depresivo en animales OVX con y sin remplazo hormonal.

Esta primera aproximación entre el SAG y la rata hembra funge como base de nuevas investigaciones que pueden tener un alto impacto el tratamiento clínico de la abstinencia a drogas GABAérgicas en las mujeres.

12 REFERENCIAS

- 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 Research*, 655: 135-146.
- Baulieu, E. E., Akwa, Y. (2003). Steroid Hormones and Neurosteroids in Normal and Pathological Aging the Nervous System. *Progress in Neurobiology*, 71: 3-29.
- Bonilla, H. (2005). Regulación neuroendocrina de la conducta sexual femenina en roedores. En M. Guevara, *Aproximaciones al estudio de la neurociencia del comportamiento*, 83-106.
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B Receptors Subtypes. *TINS*, 11(3).
- Bowery, N. (1990). GABA Transporter Protein Cloned from the Rat Brain. *TIPS*, 11: 435- 437.
- 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., 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, Silva- Barrat. C., Menini, C., Riche, D. y Naquet, R. (1989). Effects of Localized, Chronic GABA Infusions into Different Cortical Areas of the Photosensitive Baboon, Papio Papio. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 72: 147-156.

- 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. (1991). The GABA-Withdrawal Syndrome. *Proc West Pharmacol Soc* 34, 227-228.
- 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 Research*, 11: 167-172
- Brailowsky, S. (2000). Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología. México: *Fondo de Cultura Económica*. 7-248.
- 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.
- 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 al GABA: 20 Años de un Modelo de Hiperexcitabilidad Neuronal. *Salud Mental*. 35:427-434.
- Carlson, N. (2006). Fisiología de la Conducta. México: *Pearson*, 120-140.
- 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.

- Casasola, C., Montiel, T., Calixto, E., Brailowsky, S. (2004). Hiperexcitability Induced by GABA Withdrawal Facilitates Hippocampal Long-term Potentiation. *Neuroscience*, 126: 163-171
- Clement, Y. y Chapouthier, G. (1997). Biological Bases of Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Rev.*, 22: 623-633.
- Cornejo, J. M. (2011). *Análisis del Efecto de la Hiperexcitabilidad Neuronal que Caracteriza al Síndrome de Abstinencia a Diazepam sobre la Conducta Sexual y de Ansiedad de la Rata*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- 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.
- Croakin, P., Levinson, A. y Daskalakis, Z. (2011). Evidence for GABAergic Inhibitory Deficits in Major Depressive Disorder. *Neuroscience and Behavioral Rev.*, 35:818-825.
- Czlonkowska, A., Zienowicz, M., Bidzinski, A., Maciejak, P., Lehner, M., Taracha, E., Wislowska, A. y Plaznik, A. (2003). The Role of Neurosteroids in the Anxiolytic, Antidepressive- and Anticonvulsive effects of Selective Reuptake Inhibitors. *Medical Sci. Mon*, 9: RA270-275.
- Detke, M. y Lucky, I. (1996). Detection of Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants in the Rat Forced Swimming Test: the Effects of Water Depth. *Behavioural Brain Researc*, 73: 43-46.
- Falnanagan- Cato, L.M. (2011). Sex Differences in the Neural Circuit that Mediates Female Sexual Receptivity. *Frontiers in Neurobiology*, 124- 136.
- Feldman, A., Meyer, C., Quesner, C. (1996). Principles of Neuropsychopharmacology. *Academic Press*. 250-290.

- Fernández- Guasti, A., Larsson, K. y Beyer, C. (1986). Lordosis Behavior and GABAergic Neurotransmission. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24: 673-676.
- Fernández-Guasti, A. y López-Rubalcava, C. (1997). Modification of the Anxiolytic Action of 5-HT_{1A} Compounds by GABA-Benzodiazepine Agents in Rats. *Pharmacology Biochem Behavior*, 60: 27-32.
- Fernández-Guasti, A. y Picazo, O. (1999). Sexual Differentiation Modifies the Allopregnanolone Anxiolytic Actions in Rats. *Psychoneuroendocrinology*, 24: 251-267.
- 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.
- Foster, A., y Kemp, J. (2006). Glutamate- and GABA- based CNS Therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 7-17.
- Frye, C. (2001). The Role of Neurosteroids and Non genomic Effects of Progestins in the Ventral Tegmental Area in Mediating Sexual Receptivity in Rodents. *Hormones and Behavior*, 40: 226- 233.
- Frye, C. A. y Edinger, K. L. (2004). Testosterone's Metabolism in the Hippocampus may Mediate its anti-anxiety Effects in Male Rats. *Pharmacol, Biochem Behavior*, 78: 473-481.
- Frye, C. A. (2011). Progesterone Attenuates Depressive Behavior of Younger and Older Adult C57/BL6, Wildtype and Progesterone Knockout Mice. *Pharmacol, Biochem Behavior*, 99: 525-531.
- 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.
- García-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.
- González, R. y Hernández, M. (2002). Aspectos Motivacionales de la Conducta Sexual. En M. Hernández, *Motivación Animal y Humana*. 127- 151.
- Hull, E. M. y Domínguez, J. M. (2007). Sexual Behavior in Male Rodents. *Hormones and Behavior*, 52: 45-55.
- Justel, N., Bentosela, M. y Mustaca, A. E. (2009). Comportamiento Sexual y Ansiedad. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 41: 429-444.
- Kiersten, S. (2012). Anxiety and depression: Mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA_A receptor subtypes. *Neuropharmacology*, 62: 54-62.
- King, S. R. (2008). Emerging Roles of Neurosteroids in Sexual Behavior and Function. *Journal of Andrology*, 29: 524-532.
- Kokras, N., Dalla, C., Sideris, A. C., Dendi, A., Mikail, H. G., Antoniou, K. y Papadopoulou-Daifoti, Z. (2012). Behavioral Sexual Dimorphism in Models of Anxiety and Depression due to Changes in HPA Axis Activity. *Neuropharmacology*, 62: 436-445.
- Krogsgaard- Larsen, P., Falch. E., Larsson, O., y Schousboe, A. (1987). GABA Uptake Inhibitors: Relevance to Antiepileptic Drug Research. *Epilepsy Research*, 1. 77-93.
- Lader, M. y File, S. (1987). The Biological Basis of Benzodiazepine Dependence. *Psychological Medicine* 17: 537-547.

- LeGal La Salle, G., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R. (1988). Local Asymptomatic Status Epilepticus Induced by Withdrawal of GABA Infusion into Limbic Structures. *Experimental Neurology*, 101: 411-417.
- Lucio, R. y Tlachi- López. (2008). Análisis de la Cópula y el Eyaculado de la Rata Albina (*RattusNorvegicus*): Manual de Laboratorio. México: *Universidad Autónoma de Tlaxcala*. 11-26
- Martín-García, E., Darbra, S. y Pallarès, M. (2007). Implicaciones de los Neuroeseroides en la Conducta Normal y Patológica. *Revista de Neurología*, 44: 661-676.
- Martínez-Mota, L., y Fernández-Guasti, A. (2003). Testosterone-dependent Antidepressant-like Effect of Noradrenergic but not of Serotonergic Drugs. *Pharmacol, Biochem Behavior*, 78: 711-718.
- Martínez-Mota, L. Cruz-Martínez, J. J., Márquez-Baltazar, S. y Fernández-Guasti, A. (2008). Estrogens Participate in the Antidepressant-like Effect of Desipramine and Fluoxetine in Male Rats. *Pharmacol, Biochem Behavior*, 88: 332-340.
- Martínez-Mota, L., Ulloa, R. E., Herrera-Pérez, J., Chavira, R. y Fernández-Guasti, A. (2011). Sex and Age Differences in the Impact of Forced Swimming Test on the Level of Steroid Hormones. *Physiology and Behavior*, 104: 900-905.
- Majewska M., Harrison N., Schwartz R., Barker J., y Paul S., (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturates-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 232: 1004-1007
- 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.

- 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.
- Medina, M., Elenaborges, G, Lara C., Benject, C., Blanco, J., Fleis,C., Villatorio, J., Rojas, E., Zambrano, J., Casanova, L., Aguilar, S., (2003) Prevalencia de trastornos mentales y usos de servicios: Resultados de la encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México .*Salud Mental*,1-16.
- Miguel, A. (2012). *Administración Crónica de Diazepam 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.
- 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.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D. y Rodwell, V. (2001). *Bioquímica de Harper*. México: Manual Moderno. 31-41.
- Möhler, H. (2012). The GABA System in Anxiety and Depression and its Therapeutic Potential. *Neuropharmacology*, 62: 42-53.
- Nelson, H, Mandiyan, S. & Nelson, N. (1990). Cloning of the Human Brain GABA Transporter. *FEBS Letters*.269: 181-184.
- Nishimura, H., Tsuda, A., Oguchi, M., Ida, Y. y Tanaka, M. (1987). Is Immobility of Rats in the Forced Swimming Test “Behavioral Despair?” *Physiology and Behavior*, 42: 93-95.

- Olsen, R. Tobin, A (1990). Molecular Biology of GABA_A receptors. *FABSEB J*, 4: 1469-1480.
- Paredes, R. y Anders, A. (1991). GABA and Behavior: The Role of Receptor Subtypes. *Neuroscience Behavioral Rev*, 16: 145-170.
- Parker, K.; Lazo, J. y Brunton L. (2006). Goodman&Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México: *Mc Graw Hill Interamericana*. 291-298.
- Paxinos, G. y Watsonm, C. (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*. 20-39.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. y Briley, M. (1985). Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci Methods*, 14: 149-167.
- Penell, P. (2009). Hormonal aspects of epilepsy. *Neurologic.Clinics*, 21: 1-27.
- Petty, F., Kramer, G.L. y Rush, A.J. (1994). Low Plasma GABA is a Stable Trait Marker of Mood Disorder. *Biol Psychiatry*, 35: 615- 747.
- Picazo, O., Estrada-Camarena, E. y Harnández-Aragón, A. (2006). Influence of the Post-Ovariectomy Time Frame on the Experimental Anxiety and the Behavioural Actions of some Anxiolytic Agents. *European Journal of Pharmacology*, 530: 88-94.
- Pimentel, A.K. (2013). *Evaluación de la conducta sexual, de ansiedad y de depresión durante el síndrome de abstinencia a GABA en la rata macho*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Pisu, M. G. y Serra, M. (2004). Neurosteroids and Neuroactive Drugs in Mental Disorders. *Life Sciences*, 74: 3181-3197

- Porsolt, R. D., Anton, G. Blavet, N. y Jalfre M. (1978). Behavioural Despair in Rats: a New Model Sensitive to Antidepressant Treatments. *European Pharmacol*, 47: 379- 371.
- Purves, D., Augustine G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S. McNamara, J. O. & Williams, S. M. (2006). Neurociencia. México: *Panamericana*. 156-160.
- 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>
- Reddy D., Kim Y., Rogawski M. (2001) Neurosteroid withdrawal model of premenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsy*, 42: 294-302.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. y Tapia, R. (1994). Decrease of Glutamate Descarboxilase Activity after *IN VIVO* Cortical Infusion of γ -Aminobutyric Acid. *Neurochemistry*, 24, 363- 368.
- Sandeep K., Patrizia P., David W., Douglas M., Jaime Diaz-Granados., Rebecca H., y Leslie M. (2009). The role of GABAA receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psicopharmacology*. 205:529-564.
- 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. *Journal of Neurophysiol*, 85: 2159-2165.

- Silva-Barrat, C. y Champagnat, J. A. (1995). Potassium Current Controls Burst Termination in Rat Neocortical Neurons after GABA Withdrawal. *Neuroscience Letters*, 89(2): 105-108.
- Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, R., Franklin, R. J. M., García-Segura, L. M., Lambert, J. J., Mayo, W., Melcangi, R. C., Parducz, A., Suter, U., Carelli, C., Baulieu, E. E., Akwa, Y. (2003). Steroid Hormones and Neurosteroids in Normal and Pathological aging the Nervous System. *Progress in Neurobiology*, 71: 3-29.
- Smith SS, Shen H, Gong QH, Zhou X. (2007). Neurosteroids regulation of GABA-A receptors: Focus on the alpha 4 and delta subunits. *Pharmacology and Therapeutics*, 116: 58-76.
- Rodgers, R.J. y Dalvi, A. (1997). Anxiety, Defense and the Elevated Plus-Maze. *Neuroscience Biobehavioral Rev*, 21 (6): 801-10.
- Uusi-Oukari M. y Korpi ER. (2010) Regulation of GABA receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacological Review*. 62:97-135.
- Will, B., Toniolo, G., Brailowsky, S. (1988). Unilateral Infusion of GABA and Saline into the Nucleus of Rats: 1. Effect on Motor Function and Brain Morphology. *Behavio Brain Res*, 27: 123-129.
- Veliskova, J. (2006). The role of estrogens in seizure and epilepsy: Te bad guys or the good guys? *Neuroscience*, 138: 837-844.
- Yan Li. (2012). A rodent model of premenstrual dysphoria: Progesterone withdrawal induces depression-like behavior that is differentially sensitive to classes of antidepressants. *Behavio Brain Res*, 234: 238-247.

Zorumsky, C. (2013). Neurosteroids, stress and depression: Potential therapeutic opportunities. *Neuroscience and Biobehavioral Rev*, 37: 109-122.

Zigmond, M (1999) *Fundamental Neuroscience*. EUA: *Academic Press*: 212-214.