



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“Administración prenatal de diazepam como promotor de conductas adictivas a drogas en la edad adulta de la rata.”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Licenciado en Psicología**

**P R E S E N T A**

**MIGUEL MARTÍNEZ ALEJANDRO DANIEL**

**DIRECTOR**

**DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ.**

**REVISOR**

**DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO.**

**SINODAL(ES)**

**DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ.**

**DR. OSCAR ZAMORA ARÉVALO.**

**LIC. KARINA SIMÓN ARCEO.**



**2012**



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.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de visitas a la sala de urgencias relacionadas con el uso inadecuado de drogas sedantes e hipnóticas en hospitales de E.U.....	9
Figura 2 – Estructura química de las BZDs.....	10
Figura 3 – Estructura química del Dz.....	12
Figura 4 –Metabolismo de las benzodicepinas.....	13
Figura 5 –Farmacocinética del Dz en seres humanos.....	14
Figura 6 –Modelo de actividad de las BZDs y su interacción con el receptor GABA <sub>A</sub> .....	15
Figura 7 - Síntesis, liberación, recaptura y metabolismo del GABA.....	17
Figura 8 - Esquema del receptor GABA <sub>A</sub> así como sus sitios de acoplamiento.....	20
Figura 9 - Eventos del desarrollo y ontogenia que son blancos de la administración de drogas.....	23
Figura 10 - Mecanismos de acción del Dz en el desarrollo de las neuronas.....	26
Figura 11 - Circuito mesocorticolímbico del sistema de recompensa en la rata.....	33
Figura 12 - Las neuronas de proyección espinosa media (MSNs) de la vía directa.....	35
Figura 13 –Modulación de la función y plasticidad sináptica en el área tegmental ventral (VTA) por las drogas de abuso.....	37
Figura 14 - Procedimiento realizado en ratas hembras pertenecientes al grupo experimental.....	43
Figura 15 - Procedimiento realizado en ratas hembras pertenecientes al grupo control.....	44
Figura 16 - Laberinto elevado en cruz (LEC).....	45
Figura 17 - Diseño de la caja de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL).....	49
Figura 18 – Esquema del procedimiento realizado durante la fase de condicionamiento en la prueba de CPL.....	51
Figura 19 - Procedimiento realizado durante la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar.....	52
Figura 20 – Perfil ansiogénico en ratas madre con abstinencia a un tratamiento crónico con Dz (35 días; gestación y lactancia).....	53
Figura 21 – Perfil ansiogénico en ratas macho cuyas madres tuvieron abstinencia a Dz .....	55
Figura 22 – Latencia e incidencia de la génesis de crisis convulsivas inducidas por PTZ en ratas macho expuestas a Dz en etapas de su desarrollo fetal y posnatal temprano .....	57
Figura 23 – Cambio en la preferencia de los animales hacia los compartimentos de la caja de CPL antes y después del tratamiento con solución salina o morfina .....	61
Figura 24 – Comparación en el cambio de preferencia de lugar entre grupos.....	65

# ÍNDICE

<b>GLOSARIO.....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>I - INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>II - MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 - BENZODIACEPINAS (BZDs).....</b>	<b>8</b>
2.1.1 - <i>Datos sobre el consumo de BZDs.....</i>	<i>9</i>
2.1.2 - <i>Química y relación estructura-actividad de las BZDs.....</i>	<i>10</i>
2.1.3 - <i>Mecanismo de acción de las BZDs.....</i>	<i>11</i>
<b>2.2 - DIAZEPAM (DZ).....</b>	<b>11</b>
2.2.1 – <i>Farmacocinética del Dz.....</i>	<i>13</i>
2.2.2 – <i>Farmacodinamia del Dz.....</i>	<i>14</i>
<b>2.3 – ÁCIDO <math>\gamma</math>-AMINO BUTÍRICO (GABA).....</b>	<b>15</b>
2.3.1 - <i>Síntesis y metabolismo del GABA.....</i>	<i>16</i>
2.3.2 – <i>Fisiología del GABA.....</i>	<i>18</i>
2.3.3 - <i>Receptores GABA<sub>A</sub>.....</i>	<i>19</i>
2.3.4 - <i>Receptores GABA<sub>B</sub>.....</i>	<i>21</i>
<b>2.4 - PAPEL DE LOS NEUROTRANSMISORES EN EL NEURODESARROLLO EMBRIONAL.....</b>	<b>22</b>
2.4.1 – <i>Efectos sinápticos de las exposiciones prenatales a BZDs. ....</i>	<i>24</i>
2.4.2 - <i>Mecanismos implicados en la administración prenatal de Dz.....</i>	<i>25</i>
<b>2.5 - DROGADICCIÓN.....</b>	<b>28</b>
2.5.1 - <i>Drogadicción y alostasis.....</i>	<i>30</i>
2.5.2 - <i>Neurocircuito del reforzamiento.....</i>	<i>31</i>
2.5.3 - <i>Interacción del NAc en procesos de reforzamiento y aversión. ....</i>	<i>34</i>
2.5.4 - <i>Cambios plásticos en el sistema mesolímbico dopaminérgico derivados de una exposición crónica a drogas de abuso .....</i>	<i>37</i>
<b>III - JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>IV - OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>V - HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>VI - MÉTODO .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1 - MATERIAL .....</b>	<b>41</b>
6.1.1 - <i>Aparatos .....</i>	<i>41</i>
6.1.2 - <i>Drogas.....</i>	<i>41</i>
<b>6.2 - ANIMALES.....</b>	<b>41</b>

<b>6.3 - PROCEDIMIENTO.....</b>	<b>42</b>
6.3.1 - Fase 1 (Administración de Dz y pruebas realizadas a ratas gestantes).....	42
6.3.2 - Prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC). .....	44
6.3.3 - Fase 2 (Grupos de ratas macho hijos de madres tratadas crónicamente con Dz).....	45
6.3.4 - Inducción de crisis convulsivas por Pentilenetrazol (PTZ).....	48
6.3.5 - Prueba de Condicionamiento de Preferencia de Lugar (CPL).....	49
<b>VII - RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
7.1 - MEDICIÓN DE LA ANSIEDAD EN EL LEC EN LAS RATAS MADRE CON ABSTINENCIA A DZ.....	53
7.2 – MEDICIÓN DE LA ANSIEDAD EN EL LEC DE LAS RATAS MACHO CUYAS MADRES TUVIERON ABSTINENCIA A DZ.....	55
7.3 – ESTUDIO DEL UMBRAL DE LAS CRISIS CONVULSIVAS INDUCIDAS POR PTZ EN RATAS MACHO EXPUESTAS A DZ EN ETAPAS DE SU DESARROLLO FETAL Y POSNATAL TEMPRANO.....	57
7.4 – EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DZ EN ETAPAS DEL DESARROLLO FETAL Y POSNATAL TEMPRANO EN LA SUSCEPTIBILIDAD PARA ADQUIRIR ADICCIÓN A MORFINA EN RATAS MACHO.....	59
7.5 - ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS TIEMPOS DE PREFERENCIA EN EL CPL .....	64
<b>VIII – DISCUSIÓN .....</b>	<b>69</b>
8.1 – LA INTERRUPCIÓN ABRUPTA DE UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON DZ GENERA UN SÍNDROME DE ABSTINENCIA EN RATAS MADRE: EVALUACIÓN DE LA ANSIEDAD.....	71
8.2 – LA EXPOSICIÓN DE DZ DURANTE EL DESARROLLO PRENATAL Y POSNATAL TEMPRANO, GENERA UN ESTADO DE ANSIEDAD EN LAS RATAS MACHO ADULTAS.....	73
8.3 – LA SUSCEPTIBILIDAD PARA GENERAR CRISIS CONVULSIVAS NO SE MODIFICA POR LA EXPOSICIÓN PRENATAL Y POSNATAL DE DZ. ....	75
8.4 – LA EXPOSICIÓN A DZ DURANTE EL DESARROLLO FETAL Y POSNATAL TEMPRANO INCREMENTA LA SUSCEPTIBILIDAD PARA INDUCIR ADICCIÓN A MORFINA EN RATAS MACHO. ....	76
<b>X - REFERENCIAS .....</b>	<b>80</b>

## GLOSARIO

AMG	amígdala
AMPA	receptores a glutamato “ácido metil-3-hidroxi 5-metil 4-oxazole propiónico”
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AOAA	ácido aminooxiacético
APA	Asociación Americana de Psiquiatría
ARNm	ácido ribonucleíco mensajero
BA	brazos abiertos
BC	brazos cerrados
BNST	núcleo basal de la estría terminalis
BZD(s)	benzodiazepina(s)
CA	cíngulo anterior
Ca <sup>2+</sup>	ión calcio
Cl <sup>-</sup>	ión de cloro
COF	corteza orbitofrontal
CPF	corteza prefrontal
CPL	condicionamiento de preferencia de lugar
Craving	anhelo/compulsión
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
DHP	dehidroprogesterona o 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -20-diona
Dz	diazepam
EEG	electroencefalograma, electroencefalográfico
EPSCs	corrientes postsinápticas excitatorias
GABA	ácido ( $\gamma$ ) gamma amino butírico
GABA <sub>A</sub>	receptor ionotrópico de GABA (tipo A)
GABA <sub>B</sub>	receptor metabotrópico de GABA (tipo B)
GABA <sub>C</sub>	receptor ionotrópico de GABA (tipo C)
GABA-T	enzima GABA-transaminasa o $\alpha$ -cetoglutarato transaminasa
GAD	enzima ácido glutámico descaboxilasa o L-glutamato 1-carboxilasa-liasa
GAT1-4	transportador de GABA (1-4)
GDP	guanosin difosfato
G <sub>i</sub>	proteína G inhibitoria
G <sub>s</sub>	proteína G estimulante
GLU	glutamato o ácido glutámico
GluR1	subunidad funcional del receptor AMPA
GluR2	subunidad disfuncional del receptor AMPA
GMPc	guanosin monofosfato cíclico
GTP	guanosin trifosfato
H <sup>+</sup>	ión de hidrógeno
HCO <sub>3</sub>	ácido carbónico
IPSP	potencial post-sináptico inhibitorio
INPRFM	Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñíz”
K <sup>+</sup>	ión de potasio
LEC	laberinto elevado en cruz
LDTg	área tegmental laterodorsal
LH	hipotálamo lateral

LTD	depresión a largo plazo
LTP	potenciación a largo plazo
min(s)	minuto(s)
MSNs	neuronas de proyección espinosa media (GABAérgicas del NAc)
Na <sup>+</sup>	ión de sodio
NAc	núcleo accumbens
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido
NMDA	receptor ionotrópico de glutamato “N-metil D-aspartato”
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
Priming	sublimación
PTZ	pentilenetetrazol
SAD	síndrome de abstinencia a diazepam
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
SSA	succinato semialdehído
SSADH	succinato semialdehído deshidrogenasa
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP	tetrahidroprogesterona
VP	ventral pálido
VTA	área tegmental ventral

## RESUMEN

El estudio de la drogadicción, de sus bases bioquímicas y fisiológicas, así como las posibles causas que subyacen a esta compleja conducta se han convertido en un tema de investigación. En años recientes se le ha dado importancia al rol que juega el sistema GABAérgico dentro del neurocircuito del reforzamiento, ya que este funge como una señal de retroalimentación negativa cuyo fin es evitar que se generen conductas compulsivas relacionadas a los estímulos reforzantes. Aunado a esto el GABA es uno de los primeros neurotransmisores que aparecen durante el desarrollo fetal y este tiene una acción trófica para la formación de otros circuitos de neurotransmisión, como el de las aminas biogénicas, las cuales están implicadas en el neurocircuito del reforzamiento. Este estudio plantea que una alteración en la formación del sistema GABAérgico durante el desarrollo fetal y posnatal temprano de las ratas macho, tendrá consecuencia a largo plazo; el desarrollo de un estado de ansiedad basal, susceptibilidad a generar crisis convulsivas, dichas alteraciones fomentarán el desarrollo de adicción en edad adulta.

Para lo cual se utilizaron ratas Wistar hembras gestantes, a las que se les administró 10mg/Kg de diazepam vía oral durante su gestación y lactancia (madres Dz, N=11) y 48hrs después de la suspensión del fármaco fueron evaluadas con el laberinto elevado en cruz, en donde dichos animales presentaron un perfil ansiogénico en comparación al grupo control. Asimismo, sus crías macho (machos Dz, N=91) a una edad adulta fueron evaluadas: 1) En el LEC se identificó un estado de ansiedad en estos animales con respecto al control. 2) Con la administración de 30mg/Kg de PTZ no se identificaron cambios significativos en el umbral de inducción de crisis epilépticas con respecto al grupo control. 3) La prueba de condicionamiento de preferencia de lugar, permitió cuantificar una reducción en la dosis umbral de morfina (1mg/Kg), necesaria para generar adicción, efecto comparable a la administración de una dosis alta de morfina (5mg/Kg).

Estos resultados sugieren que una exposición a diazepam durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano en ratas macho genera a una edad adulta un estado de ansiedad basal similar al generado por una abstinencia a diazepam. Además, genera una mayor susceptibilidad a desarrollar adicción a morfina, esto debido no solo a la alteración en el desarrollo normal del sistema GABAérgico sino también en el desarrollo de otros sistemas de neurotransmisión.

## **Administración prenatal de diazepam como agente teratógeno promotor de conductas adictivas a drogas en la edad adulta de la rata.**

### **I - INTRODUCCIÓN.**

Las benzodiacepinas (BZDs), son los principales agentes ansiolíticos, hipnóticos y sedantes usados en el tratamiento de trastornos psiquiátricos como depresión, ansiedad, anorexia nerviosa y bulimia, entre otras, dichas enfermedades tienen una alta incidencia en mujeres en edades fértiles (Parker, et al., 2006; Rang, et al., 2007; Marinucci, et al., 2011). En este contexto la prescripción de BZDs en mujeres gestantes sigue siendo un tema controvertido y su uso está restringido a casos realmente meritorios, ya que se han documentado diversos trastornos en niños que recibieron tratamiento con estos fármacos durante su desarrollo fetal, como hipotensión, disminución en la función respiratoria, hipotermia y malformaciones cardíacas (Leppée, et al., 2010; Marinucci, et al., 2011). Estudios en murinos han demostrado que la exposición a BZDs durante el desarrollo fetal genera retrasos en el desarrollo, déficits cognitivos, reactividad al estrés, así como una disminución en la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> y alteraciones en la expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de dicho receptor (Cannizzaro C., et al. 2002; Cannizzaro E., et al. 2005; Neutel, 2005; Picard, et al. 2008).

Se sabe que las BZDs son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub>, el cual está estrechamente relacionado al neurocircuito de la adicción y el reforzamiento fungiendo como un freno o amortiguador en la adquisición y mantenimiento de las conductas adictivas, produciendo aversión (Camí y Farré, 2003; Goldstein y Volkow, 2002; Koob y Volkow, 2010). Ya que el sistema GABAérgico es filogenéticamente uno de los primeros sistemas de neurotransmisión que se forman, este obtiene una gran relevancia en el desarrollo fetal, ya que a partir de este se forman otros sistemas de neurotransmisión como el de las aminas biogénicas (Liu et al., 1997; Thompson et al., 2009). Con estos antecedentes decidimos investigar si una alteración del sistema GABAérgico inducida por la administración de diazepam (Dz), durante el desarrollo fetal y posnatal temprano, facilita o predispone la adquisición de una adicción en la edad adulta de la rata.

## II - MARCO TEÓRICO

### 2.1 - Benzodiazepinas (BZDs)

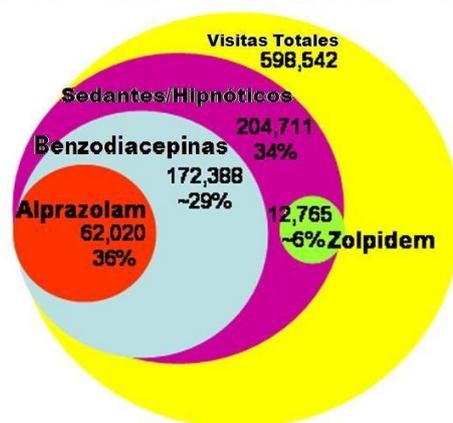
Las benzodiazepinas (BZDs) son el principal centro de atención en esta tesis por lo que se hará una recapitulación de datos acerca de su consumo, su estructura química y su mecanismo de acción. Las BZDs pueden definirse como moléculas farmacológicamente activas con efectos sedantes, ansiolíticos, amnésicos, miorelajantes y anticonvulsivantes. De las cuales existen muchas; algunas de las más utilizadas a la fecha son: el clordiazepóxido, el diazepam (del cual se ahondará en capítulos posteriores), el oxazepam, el clorazepato, el lorazepam, el alprazolam, el clonazepam y el zolpidem (Brailowsky, 1995). Por lo general actúan uniéndose en la interface entre las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>  $\alpha$  (1, 2, 3 ó 5) y las subunidades  $\gamma$  potenciando la respuesta a GABA (Jacob et al., 2008).

El uso de las BZDs se dio de forma casual, a finales de los años 40s con F. Berger y sus experimentos en el laboratorio, a partir de ahí la primera BZD fue el clordiazepóxido, la cual fue sintetizada por accidente en 1961 por los laboratorios ROCHE (Rang et al., 2007; Ator, 2005). Las BZDs fueron desarrolladas en respuesta a la necesidad de ansiolíticos seguros y efectivos (Uusi-Oukari y Korpi, 2010), ya que durante la primera mitad del Siglo XX, la forma de tratar la ansiedad era prescribiendo sedantes, como los barbitúricos (Rang, et al., 2007).

Esto generó que las BZDs rápidamente encontraran gran aceptación por parte de la comunidad médica, debido a su mucho mayor seguridad en caso de sobredosis con respecto a los barbitúricos y la creencia general de que carecían de un potencial adictivo (Ator, 2005), dicha confianza en la seguridad de las BZDs llevó a que fueran tan demandadas, que incluso eran prescritas simplemente para facilitar a la gente el afrontar las dificultades de la vida diaria (Ator, 2005; Rang, et al., 2007). El impacto de estos eventos repercuten hoy en día, ya que aun cuando actualmente, el uso de BZDs se halla restringido a tratamientos relativamente breves de ansiedad, aplicación en la que suelen ser más evidentes sus efectos terapéuticos y menos probables los efectos secundarios (Neutel, 2005). Hay veces que la terapia con BZDs se puede prolongar, gracias a eso se han podido asociar serios problemas al uso de BZDs, como efectos teratógenos, así como el desarrollo de tolerancia y dependencia más rápida, sobre todo en los efectos sedantes y atáxicos con respecto a los efectos ansiolíticos (Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

### 2.1.1 - Datos sobre el consumo de BZDs

Las BZDs al ser fármacos usados ampliamente en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas, cada vez más comunes en nuestra sociedad como: son la ansiedad o la depresión, han incrementado su abuso en los últimos años. Tal y como lo demuestran diversas encuestas; la ingesta de tranquilizantes sin receta, entre 2000-2001, alcanzó el 2,5% de la población de 15 a 64 años. En comparación con años anteriores, aparece un ligero incremento en el consumo de estas sustancias, la prevalencia de dicho consumo durante los últimos doce meses pasó del 2% en 1997 al 2,5% en 2001, en México de acuerdo con la Encuesta Nacional de Adicciones 2008 tan solo el consumo de drogas médicas sin prescripción está liderado por los ansiolíticos en promedio el 1% de la población masculina y el 0.6% de la población femenina los consume, teniendo en ambos casos un rango de edad entre 26 y los 65 años de edad. Datos en Estados Unidos muestran que del 10 al 15% de los adultos han consumido BZDs en un periodo de 12 meses y el 2% las usa crónicamente (Neutel, 2005).



**Figura 1 – Esquema de visitas a la sala de urgencias relacionadas con el uso inadecuado de drogas sedantes e hipnóticas en hospitales de E.U.** En amarillo se representa el número total de visitas a la sala de urgencias, en morado los datos relacionados con el uso de sedantes e hipnóticos, en verde el uso de zolpidem, en azul el uso de benzodiacepinas en general y en rojo el uso particular de alprazolam. Imagen tomada de Licata y Rowlett, 2008.

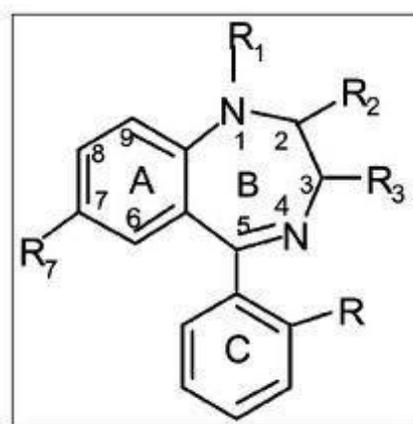
Diversas encuestas establecen que la edad de inicio en el consumo de BZDs es de 28 años, los hombres parecen ser quienes se inician el consumo de estos fármacos antes que las mujeres (hombres: 24 años; mujeres: 30 años). Fuente: encuesta domiciliaria sobre consumo de drogas en España, 2001 (población de 15 a 64 años) y encuesta sobre drogas en población escolar española, 2002 (estudiantes de 14 a 18 años). Además, según la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios

(Ministerio de Sanidad y Consumo en España), durante el año 2002 se vendieron, con receta oficial y a través de las oficinas de farmacia, 41,589,800 envases de BZDs en España, lo que supone un gasto de 121,338,099 euros.

Los datos antes mencionados muestran un riesgo latente por la prescripción indebida así como un mal uso de estos fármacos ya que de acuerdo con datos recientes (fig. 1), en E.U. el número de visitas a la sala de urgencias asociado al uso de sedantes o hipnóticos en 2005, fue del 34% del total de visitas por una prescripción no-medica de drogas de las cuales el 29% solamente fue del grupo de las BZDs (Licata y Rowlett, 2008)

### 2.1.2 - Química y relación estructura-actividad de las BZDs

La estructura química básica de las BZDs consiste en un anillo benceno (A) fusionado con un anillo diazepina de siete miembros (B). Sin embargo, todas las BZDs importantes contienen un sustitutivo 5-aril (C) y un anillo 1,4 diazepina, usando el término 5-aril-1,4-benzodiazepinas (fig. 2; Parker, et al., 2006). La naturaleza química de los sustitutivos en las posiciones 1 a 3 puede variar con amplitud e incluir anillos triazol, imidazol, fusionados en las posiciones 1 y 2. La sustitución del anillo C con una función ceto en la posición 5 y un sustituto metil en la 4, son aspectos estructurales importantes del antagonista de las BZDs llamado flumazenil (Parker, et al., 2006).



**Figura 2 – Estructura química de las BZDs.** Además de las BZDs, un gran número de compuestos no benzodiazepínicos pueden competir con las BZDs clásicas o el flumazenil para unirse a sitios específicos en el SNC. Estos compuestos incluyen representantes de las carbolinas (que contienen un núcleo indol fusionado a un anillo piridina), imidazopiridinas (zolpidem), imidazopirimidinas, imidazoquinolones y ciclopirrolonas (Parker, et al., 2006).

Los sitios de acoplamiento de las BZDs se encuentran localizados en la interface entre una subunidad  $\alpha$  y  $\gamma$  del receptor GABA<sub>A</sub>, así mismo las BZDs son influenciadas

farmacológicamente por ambas subunidades, también muchas BZDs clásicas se unen a ligandos de subreceptores  $\alpha\beta\gamma 2$  que contienen subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  o  $\alpha 5$  y que dichas subunidades poseen la misma afinidad a las BZDs (Kandel et al., 2000; Parker, et al., 2006; Rang, et al., 2007).

### 2.1.3 - Mecanismo de acción de las BZDs

Las BZDs actúan en el sistema nervioso facilitando la neurotransmisión mediada por GABA y en particular en los receptores GABA subíndice A. Al ocupar dichos receptores se produce la apertura de canales iónicos permeables al  $\text{Cl}^-$ . Cuando el  $\text{Cl}^-$  entra a la célula, el interior de ésta se vuelve más negativo, disminuyendo así su excitabilidad es decir, el GABA inhibe a la neurona (disminuyendo la probabilidad de que ésta genere potenciales de acción). Lo que hacen las BZDs es aumentar la *frecuencia* de apertura de canales de  $\text{Cl}^-$ , potencian la acción del GABA a diferencia de los barbitúricos que favorecen la neurotransmisión GABAérgica, pero aumentando la *duración* de la apertura de canales de  $\text{Cl}^-$  (Brailowsky, 1995).

Estudios neuroquímicos han demostrado que el receptor  $\text{GABA}_A$  incluye dentro de su estructura molecular, además del canal de cloro, sitios de reconocimiento para las BZDs, barbitúricos, neuroesteroides y alcohol (Parker, et al., 2006; Rang, et al., 2007).

## 2.2 - Diazepam (Dz)

El diazepam (Dz, fig. 3), es una de las primeras BZDs sintetizadas y una de las más estudiadas dentro de la investigación, ya que a partir de esta se han descrito diversos efectos característicos de las BZDs, en esta tesis se hará una recopilación de las propiedades que caracterizan a este fármaco. El Dz es uno principales agentes ansiolíticos y uno de los fármacos más usados en todo el mundo (Ribeiro, et al., 2007), ya que se estima que cerca de 2.3 millones de personas consumen algún tipo de fármaco sedante o tranquilizante (Manchikanti, et al., 2002). Así como todas las BZDs, el Dz ejerce un efecto potenciador en la acción de las neuronas del aminoácido inhibitorio, GABA y no así en neuronas glicinérgicas o glutamatérgicas (Rang, et al., 2007).

Existen diferentes presentaciones y marcas de Dz para su venta en México las más comunes son: Diastatrek<sup>®</sup> en Gel (Valeant), Ifa Fonal<sup>®</sup> (Investigación Farmacéutica), y Ortopsique 10<sup>®</sup> solución inyectable (Psicofarma), Sunzepan<sup>®</sup> en solución inyectable (Cryopharma), el más común y el más usado tanto en tratamientos clínicos como en investigación científica Valium<sup>®</sup> y Valium 10<sup>®</sup> en comprimidos y

solución inyectable (ROCHE), en el cual se basará este capítulo para explicar sus aspectos generales, farmacocinética, farmacodinamia, efectos adversos.



**Figura 3 – Estructura química del Dz.** El 7-cloro-1-metil-5-fenil-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona, tiene una estructura química compuesta por tres anillos básicos de BZDs, un hexano nitrogenado con un grupo ceto, un anillo bencénico clorurado (Cl) y un grupo hexano (Rang, et al., 2007; Flórez y Pazos, 2008; Parker, et al., 2006).

---

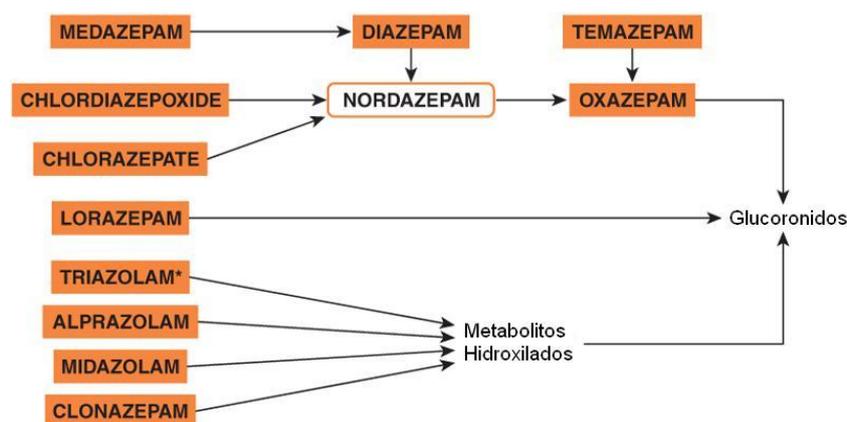
---

Como muchas otras BZDs, el Dz es usado clínicamente para el tratamiento de la depresión, la psicosis, el insomnio, además es utilizado como anestésico, hipnótico (reduciendo la latencia de sueño e incrementando el tiempo total de sueño y decrementando la actividad de ondas alfa), anticonvulsivante, relajante muscular y principalmente como tranquilizante para el tratamiento sintomático de la ansiedad, tensión y otros síntomas asociados con el síndrome de ansiedad, por ejemplo: taquicardia, fobias, agresión, etc. (Rang, et al., 2007; 110.Parker et al., 2006)

Dentro de sus efectos no deseados se encuentran: toxicidad por sobredosis (con la cual se causa sueño prolongado, sin depresión grave de la función respiratoria o cardiovascular), efectos secundarios con dosis terapéuticas (somnolencia, confusión, amnesia y pérdida de la coordinación, que afecta considerablemente las habilidades manuales, tales como el conducir) y los efectos de tolerancia (es decir, una escalada gradual de la dosis necesaria para producir el efecto deseado, esto debido a cambios a nivel del receptor) y dependencia (la interrupción abrupta del tratamiento con BZDs después de semanas o meses provoca un aumento en los síntomas de ansiedad, junto con temblores, mareos, pérdida del apetito y convulsiones; Brailowsky, 1995; Jongasma, et al., 2000; Tobler, et al., 2001; Manchikanti, et al., 2002; Rang, et al., 2007).

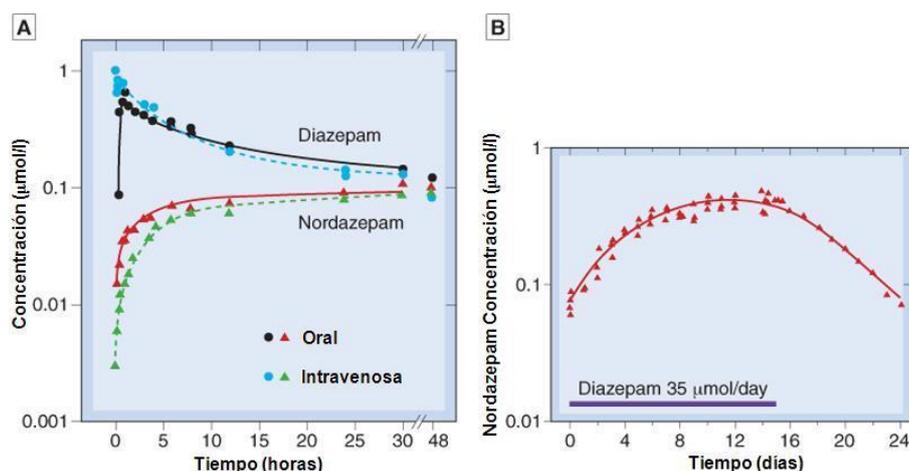
### 2.2.1 – Farmacocinética del Dz

El Dz que es administrado vía oral, se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, alcanzando su concentración plasmática máxima entre 30-90 minutos después de su ingestión, este rango puede variar dependiendo de la edad y la alimentación. El Dz y sus metabolitos se unen fuertemente a proteínas plasmáticas las cuales son altamente liposolubles causando que algunas de estas se acumulen gradualmente en la grasa corporal y también que atraviesen la barrera hematoencefálica, la vida media en su distribución llega hasta 3 horas. El Dz es convertido en el hígado a metabolitos farmacológicamente activos como el N-desmetildiazepam (nordazepam) por los citocromos P-450, P-3A4 y P-2C19 que se encuentran principalmente en el hígado, el nordazepam tiene una vida media de cercana a 60 horas, después es hidroxilado por la citocromo P-3A4 formando el metabolito activo temazepam y al final ambos metabolitos son convertidos a oxazepam (fig. 4). Su eliminación se da eventualmente como glucoronidos conjugados en la orina. Por último la vida media del Dz es relativamente larga (24 a 48 h, fig. 5), pero sus metabolitos activos pueden permanecer en la sangre o en el cuerpo por algunos días e incluso semanas (Parker, et al., 2006; Rang, et al., 2007).



**Figura 4 –Metabolismo de las benzodiazepinas.** El nordazepam (cuadro blanco), un metabolito N-desmetilado se forma a partir de una serie de BZDs (incluido el Dz), este es importante porque es biológicamente activo y tiene una vida media muy larga. Los fármacos de uso clínico se muestran en recuadros sombreados (Rang, et al., 2007).

Durante tratamientos prolongados con Dz se genera una tolerancia farmacocinética, ya que esta BDZ durante la primera aplicación induce la síntesis de novo del citocromo P-450, el cual facilita la tasa de biotransformación, que disminuye la actividad y disponibilidad del fármaco, por tal motivo en las siguientes aplicaciones se requiere una dosis mayor para alcanzar el efecto deseado (Parker, et al., 2006).



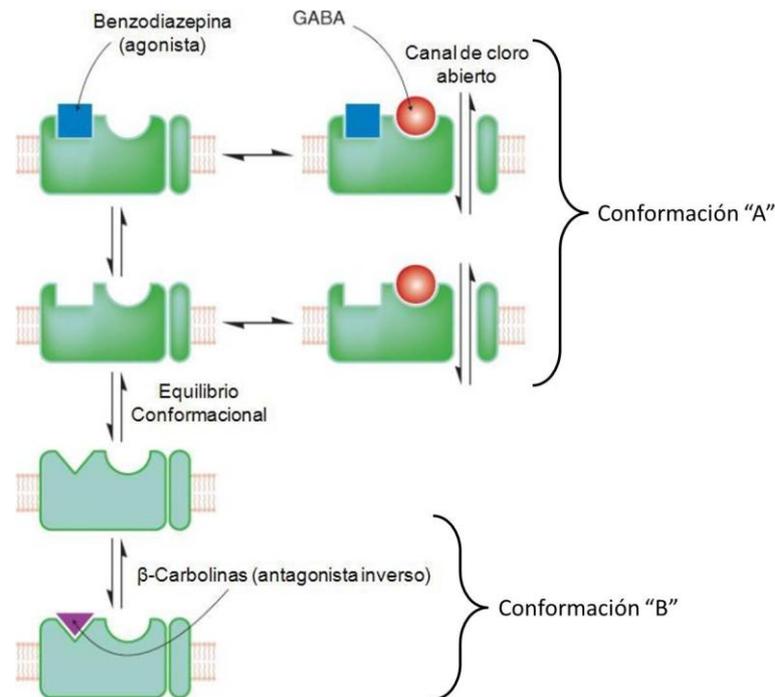
**Figura 5 –Farmacocinética del Dz en seres humanos.** Las concentraciones de Dz y nordazepam fueron tomadas después de una dosis única por vía oral o intravenosa. (A) Se observa que la desaparición es lenta de ambas sustancias después de las primeras 20 horas. (B) Se muestra una acumulación de nordazepam durante 2 semanas por una administración diaria de Dz, y a su vez una disminución lenta (vida media de alrededor de 3 días), después de interrumpir la administración de Dz (Datos de Kaplan et al. 1973 tomada de Rang, et al., 2007).

### 2.2.2 – Farmacodinamia del Dz

La idea de que existen ligandos endógenos de los receptores a BZDs, cuya función es regular la acción del GABA, es todavía incierta. El principal candidato es un péptido de 10 kDa, inhibidor del Dz vinculado y aislado en el cerebro de la rata. Este péptido se une fuertemente al sitio de unión de las BZDs en los receptores GABA<sub>A</sub> y tiene un efecto contrario al de las BZDs (antagonista), es decir, inhibe la apertura del canal de Cl<sup>-</sup> por el GABA, y cuando se inyecta en el cerebro tiene un efecto ansiogénico y proconvulsivante (Parker, et al., 2006). Otros posibles moduladores endógenos de los receptores de GABA son los metabolitos esteroideos. En la actualidad, no existe un acuerdo general sobre la identidad y la función de los ligandos endógenos (Rang, et al., 2007; Parker, et al., 2006).

Para explicar los términos de agonista o agonista inverso, se usa el modelo “dos estados” (fig. 6), el cual postula que en el receptor a BZDs existen dos conformaciones diferentes, en donde sólo una de las cuales, el estado o conformación “A” se puede unir a una molécula de GABA y abrir así el canal de Cl<sup>-</sup>. Mientras que la conformación “B” no se puede unir al GABA. Los agonistas de las BZDs, se postula que se unen preferentemente a la conformación A, lo que desplaza el equilibrio a favor de la conformación A y mejora la sensibilidad del receptor por el GABA. Los agonistas inversos se unen selectivamente a la conformación B y tienen un efecto contrario. Los antagonistas competitivos como el flumazenil se unen por igual a las conformaciones A

y B, por lo tanto no perturban el equilibrio conformacional pero antagonizan el efecto de ambos agonistas y agonistas inversos. Algunas de las variantes moleculares del receptor de GABA parecen mostrar diferentes afinidades relativas a los agonistas, antagonistas y agonistas inversos, es posible que esto refleje las diferencias en el equilibrio entre los estados A y B en función de las subunidades que componen al receptor (Parker, et al., 2006; Rang, et al., 2007).



**Figura 6 –Modelo de actividad de las BZDs y su interacción con el receptor GABA<sub>A</sub>.** Los agonistas de las BZDs (por ejemplo; Dz) y los antagonistas (por ejemplo; flumazenil) se cree que se unen a un sitio en el receptor GABA<sub>A</sub> distinto del sitio de unión del GABA. Existe un equilibrio conformacional entre los estados en los cuales en el receptor a BZDs existe una conformación de unión agonista (conformación A) y una conformación de unión antagonista (conformación B). En este último estado, el receptor GABA<sub>A</sub> tiene una afinidad muy reducida al GABA y, en consecuencia, el canal de Cl<sup>-</sup> permanece cerrado (Rang, et al., 2007).

### 2.3 – Ácido $\gamma$ -amino butírico (GABA)

Todas las BZDs actúan en el sistema GABAérgico, el cual recibe ese nombre por su principal agonista, un aminoácido endógeno llamado ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), por lo que en esta tesis se describirán diversos aspectos del GABA como son su síntesis y metabolismo, su fisiología, su distribución en el SNC y los receptores en los que actúa. El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC mamífero. El GABA ejerce un efecto inhibitorio tal, que es capaz de deprimir la excitabilidad neuronal, durante la inhibición se disminuye la probabilidad de que una

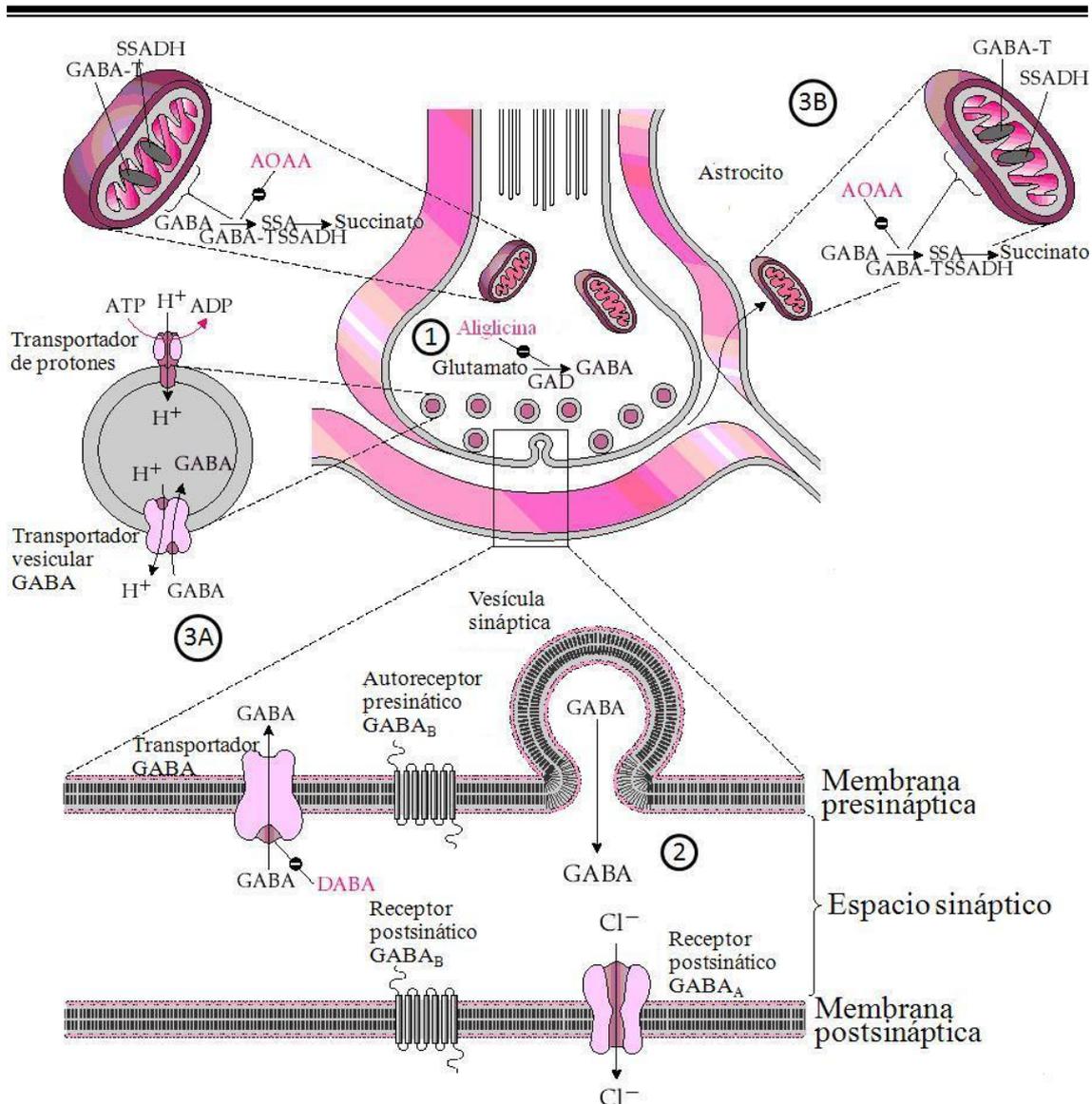
neurona genere potenciales de acción (Kandel, et al., 2000; Parker, et al., 2006; Flórez y Pazos, 2008).

Fue identificado como un componente químico único del cerebro en 1950, pero su potencia como depresor del SNC no fue reconocida inmediatamente. El GABA inicialmente fue identificado como el único aminoácido inhibidor que se encontraba exclusivamente en los nervios inhibidores de crustáceo, ya que la potencia inhibidora de los extractos obtenidos de estos medios se debía a su contenido de GABA. Además, la liberación de GABA se correlacionó con la frecuencia de estimulación del nervio inhibitorio y el incremento idéntico en la conductancia de  $Cl^-$  en el músculo. Más tarde estas mismas propiedades fisiológicas y farmacológicas ayudaron a establecer el papel del GABA en el SNC de los mamíferos, hoy en día se cuenta con datos importantes que apoyan la idea de que el GABA media las acciones inhibitorias de las interneuronas en el cerebro y permite la inhibición presináptica en la médula espinal (Parker, et al., 2006).

### **2.3.1 - Síntesis y metabolismo del GABA**

Mediante métodos inmunocitoquímicos se han localizado tanto neuronas como terminaciones nerviosas GABAérgicas y gracias a esto se ha podido determinar que este es sintetizado a partir del principal neurotransmisor excitatorio, el glutamato (fig. 7). El glutamato es el neurotransmisor más común en todo el SNC, este se sintetiza a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato, un metabolito intermediario en el ciclo del ácido tricarboxílico. Después de su liberación, el glutamato es captado de la hendidura sináptica tanto por las neuronas así como por los astrocitos, en donde se biotransforma en glutamina por la acción de la enzima glutamina sintetasa (Kandel, et al., 2000).

El GABA se produce del ácido glutámico por la acción de la enzima del ácido glutámico descarboxilasa (GAD), también conocida como L-glutamato-1-carboxilasa, que elimina un grupo carboxilo, de la que se han encontrado isoformas diferentes; GAD65 y GAD67 y están codificadas en diferentes genes, además la GAD necesita como cofactor para su funcionamiento de vitamina B<sub>6</sub> o fosfato de piridoxal (Brailowsky, 1995; Carlson, 2006). Experimentos con el compuesto *aliglicina* han descubierto que ésta inactiva a la GAD e impide así la síntesis de GABA y por lo tanto incrementa la excitabilidad neuronal y se fomenta la aparición de crisis convulsivas. (fig. 7; Carlson, 2006).



**Figura 7 - Síntesis, liberación, recaptura y metabolismo del GABA.** 1) Síntesis: el GABA es sintetizado en el citosol a partir del glutamato por la acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD; Shelp, et al., 1999). 2) Liberación: el GABA puede liberarse hacia el espacio sináptico a través de almacenes vesiculares, una vez fuera de la terminal puede acoplarse a receptores metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>) tanto presinápticos como postsinápticos y a receptores ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>) postsinápticos (Brailowsky, 1995; Carlson, 2006). 3) Recaptura: la recaptura del GABA se da por medio de autorreceptores presinápticos (GABA<sub>B</sub>) o por el transportador GABA (GAT1-4) el cual puede ser glial o neuronal (el transportador introduce GABA a las vesículas liberando una molécula de H<sup>+</sup>). Por último, el GABA es catabolizado por medio de la enzima GABA transaminasa (GABA-T) en succinato semialdehído (SSA), en la mitocondria y el succinato semialdehído (SSA) es oxidado a succinato vía un NAD<sup>+</sup>-dependiente de la SSA deshidrogenasa o SSADH (Shelp, et al., 1999; Clark, et al., 2009; imagen tomada de Feldman y Quenzer, 1984).

Un detalle curioso es que el ácido glutámico no proviene del torrente sanguíneo, sino que la misma neurona posee un mecanismo enzimático de síntesis a partir de la transaminación oxidativa a través de la  $\alpha$ -cetoglutarato transaminasa (GABA-T) o por un proceso de desaminación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa (DeLorcy y Olsen, 1994; Deutch y Roth, 1999). Otro aspecto interesante a resaltar es

que la misma enzima (GABA-T), que provee el sustrato del glutamato para la síntesis de GABA también lo degrada. El GABA es transformado a semialdehído succínico por la GABA-T en presencia de  $\alpha$ -cetoglutarato como co-sustrato para la reacción, por otro lado la inyección intravenosa del ácido aminooxiacético (AOAA) inhibe a la GABA-T generando la acumulación del GABA. Así, la enzima GABA-T es la clave de la síntesis y del catabolismo del GABA (fig. 7; Carmona, et al., 1980; Bolin y DaVanzo, 1982; Shelp, et al., 1999; Clark, et al., 2009).

### 2.3.2 – Fisiología del GABA

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

El GABA tiene efectos en ambas membranas de la sinapsis. El efecto a nivel presináptico (fig. 7), se observa mediante la activación del receptor GABA<sub>B</sub> y una subsecuente disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al botón terminal. Debido a que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un catión involucrado en la maquinaria de liberación de neurotransmisores en la terminal nerviosa, el GABA en el componente presináptico genera una disminución en la liberación de diversos neurotransmisores (Krnjević, 1997).

A nivel post-sináptico (fig. 7), el mecanismo principal se debe a un rápido incremento en la conductancia de  $\text{Cl}^-$ , lo cual tiene un efecto hiperpolarizante de la membrana neuronal (Brailowsky, 1995). Además, en algunas neuronas se incrementa una conductancia lenta de  $\text{K}^+$  fortaleciendo la hiperpolarización. A todo el evento postsináptico se le denomina potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP) (Krnjević, 1997). Recientemente se ha demostrado que durante la activación prolongada de los receptores de GABA en la dendrita, la respuesta de la membrana post-sináptica cambia de hiperpolarización a despolarización. Una explicación para el cambio del efecto inhibitorio del GABA es la siguiente: el incremento del flujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  a través del receptor ionotrópico tipo A para GABA (GABA<sub>A</sub>), incrementa la concentración de estos

aniones en el interior de la célula, por lo que disminuye su fuerza electroquímica y en consecuencia su flujo al interior de la neurona también disminuye. Además, al cambiar su potencial de equilibrio, se favorece un egreso del  $\text{HCO}_3^-$ , produciendo un evento despolarizante. Esta despolarización disminuye el bloqueo dependiente de voltaje del receptor N-metil D-Aspartato (NMDA), por parte del ión magnesio, por lo que esta actividad mediada por GABA es suficiente para la activación sináptica del receptor NMDA. De tal forma, que las respuestas postsinápticas GABAérgicas en neuronas corticales pueden consistir en una temprana “hiperpolarización somática” (también denominada respuesta h-GABA<sub>A</sub>) y una respuesta “despolarizante dendrítica” (o respuesta d-GABA<sub>A</sub>). En conclusión, los flujos de  $\text{HCO}_3^-$  contribuyen a la respuesta d-GABA<sub>A</sub>, en tanto que la respuesta h-GABA<sub>A</sub> es principalmente debida al  $\text{Cl}^-$  (Staley y Proctor, 1999).

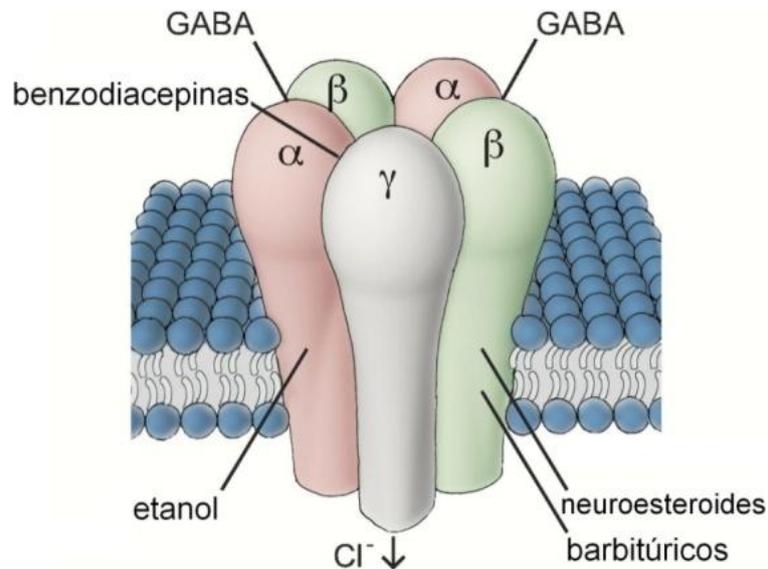
### 2.3.3 - Receptores GABA<sub>A</sub>

Los receptores GABA tipo A, son canales ionotrópicos dependientes de  $\text{Cl}^-$ , estos pueden ser abiertos por la liberación de GABA a partir de neuronas presinápticas (Parker, et al., 2006) y también pueden ser modulados por una importante variedad de fármacos neuroactivos clínicamente relevantes, incluyendo las BDZs, los barbitúricos, los anticonvulsivantes, el alcohol, los anestésicos volátiles y también existen compuestos endógenos como los esteroides neuroactivos, los cuales son moduladores alostéricos de la función del receptor (Follesa, et al., 2006; Parker, et al., 2006).

Muchas de las acciones fisiológicas del GABA son producidas vía receptores GABA<sub>A</sub> (Sieghart, et al., 1999), por ejemplo las acciones inhibitorias rápidas del GABA son mediadas por los receptores GABA<sub>A</sub> en el cerebro, además los déficits en la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> funcionales es crítica en patologías tales como: epilepsia, desórdenes de ansiedad, déficits cognitivos, esquizofrenia, depresión y **abuso de sustancias** (Jacob, et al., 2008), los receptores GABA<sub>A</sub> son antagonizados por los convulsivos alcaloides como la bicuculina (Loh y Ball, 2000).

El receptor de GABA<sub>A</sub>, por su analogía con los receptores colinérgicos nicotínicos, puede ser una proteína tetramérica o pentamérica por lo que las subunidades pueden reunirse en torno a un ion central del poro típico de todos los receptores ionotrópicos (fig. 8; Parker, et al., 2006). En el SNC, los receptores GABA<sub>A</sub> son compuestos heteropentámeros formados por diversas subunidades que van de  $\alpha_1$  a  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$

a  $\beta_4$ ,  $\gamma_1$  a  $\gamma_3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\rho_1$  a  $\rho_3$  cada una de estas subunidades con funciones, expresión y distribución diferente (Follesa, et al., 2006).



**Figura 8 - Esquema del receptor GABA<sub>A</sub> así como sus sitios de acoplamiento.** Estos son compuestos heteropentámeros que en su forma más común están conformados por dos subunidades  $\alpha$ , dos subunidades  $\beta$  y una subunidad  $\gamma$ . Los receptores GABA<sub>A</sub> contienen sitios de reconocimiento para diversas moléculas. La unión del GABA se da en dos sitios de acoplamiento al GABA en la interface entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , lo que conlleva la apertura del receptor asociado al canal de  $\text{Cl}^-$ . El sitio de acoplamiento de las benzodiazepinas está localizado entre las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . Los sitios de acoplamiento de los barbitúricos, los neuroesteroides y el etanol se encuentran en regiones transmembranales (Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

Durante el desarrollo diferencial se incrementa la expresión de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , esto sugiere, diferencias en la composición de las subunidades y propiedades funcionales del receptor GABA<sub>A</sub> durante el desarrollo (Kardos, 1999). En neuronas maduras, bajo condiciones normales, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> llevan a una hiperpolarización del potencial de membrana celular y una inhibición de la actividad neuronal, sin embargo en neuronas inmaduras, en las cuales el gradiente de iones forma transportadores de aniones que no son completamente funcionales dan como consecuencia, que la activación del receptor GABA<sub>A</sub> produzca despolarización, este proceso opuesto está relacionado en condiciones patológicas por ejemplo; el dolor neuropático (Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

Basándose en estas propiedades farmacológicas, los receptores GABA<sub>A</sub>, están involucrados en el control de la excitabilidad en el cerebro, la modulación de la ansiedad, en las conductas de ingesta de alimento y agua, en los ritmos circadianos y procesos cognitivos como son la vigilia, aprendizaje y memoria (Sieghart, et al. 1999). Asimismo, se cree que la mayoría de los receptores GABA<sub>A</sub> están compuestos por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  en un rango de 2:2:1 respectivamente, aunque existe una gran

diversidad de patrones en la expresión de complejos de subunidades GABA<sub>A</sub> y sus combinaciones, las subunidades más comunes y las que se distribuyen abundantemente en el SNC son las  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , en cuanto a los subtipos de receptor GABA<sub>A</sub> el más abundante es el  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ , el cual está presente en muchas regiones cerebrales (Parker, et al. 2006), como lo muestra la tabla 1.

<b>Tabla 1 – Subtipos y distribución del receptor GABA<sub>A</sub>.</b>	
<b>Subtipos GABA<sub>A</sub>R</b>	<b>Regiones de distribución en el SNC</b>
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Se encuentra en la capa granular del bulbo olfatorio, capa de células polimorfas y región CA3 del hipocampo, interneuronas corticales, globo pálido y varios núcleos talámicos.
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	Han sido colocalizados en el bulbo accesorio olfatorio, el estriado, el septum, la capa molecular del giro dentado e hipotálamo
$\alpha_2\beta\gamma_1$	Esta combinación de la subunidad $\alpha_2$ es posible y se sugiere que se expresa en la glía de Bergmann y en núcleos del sistema límbico.
$\alpha_3\beta\gamma_2$	Este subtipo es predominantemente expresado en muchas células monoaminérgicas de varios núcleos cerebrales
$\alpha_3\theta\epsilon$	Esta combinación de subunidades es probable porque sus ARNm son encontrados en altas concentraciones en el locus ceruleus de la rata
$\alpha_4\beta\gamma_2$	Este subtipo del receptor GABA <sub>A</sub> es expresado en el tálamo, caudado, putamen y giro dentado
$\alpha_4\beta_2\delta$	El relevo de los núcleos talámicos y corteza cerebral expresan este subtipo.
$\alpha_4\beta_3\delta$	Es expresado en células granulares dentadas, corteza cerebral y predominantemente en el estriado.
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	Este subtipo es expresado en neuronas piramidales de CA1
$\alpha_6\beta\gamma_2, \alpha_6\beta_2\delta, \alpha_6\beta_3\delta$	Estos subtipos son expresados en las células granulares del cerebelo y núcleo coclear.

Tabla 1. En la columna de la izquierda se presentan las subunidades que componen los diferentes subtipos del receptor GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) y en la columna de la derecha se describe la distribución en el SNC de los diferentes subtipos del receptor GABA<sub>A</sub> (Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

### 2.3.4 - Receptores GABA<sub>B</sub>

El segundo tipo de receptores GABA son los GABA<sub>B</sub>, estos se clasifican como receptores metabotrópicos, por lo que tienen una acción lenta y prolongada (Jacob, et al. 2008), los cuales son miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G y

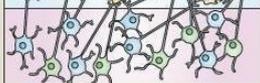
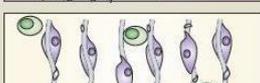
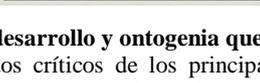
actúa tanto en vías bioquímicas como en la regulación de canales iónicos (Parker, et al. 2006), es decir, interactúan con las proteínas  $G_i$  para inhibir la adenilato ciclasa, activar canales de  $K^+$  y reducir la conductancia de  $Ca^{2+}$ , además, son insensibles a la bicuculina y a la actividad estereoselectiva del baclofen. Los receptores  $GABA_B$  funcionan a nivel presináptico como autorreceptores, inhibiendo la liberación de GABA y pueden jugar el mismo rol en neuronas que liberan otros neurotransmisores (es decir en neuronas no-GABAérgicas como heterorreceptores) y se componen de las subunidades  $GABA_{B1a}$  y  $GABA_{B2}$ , mientras que a nivel postsináptico los receptores  $GABA_B$  se expresan en neuronas GABAérgicas o no-GABAérgicas, regulando la expresión de receptores iónicos y están constituidos por las subunidades  $GABA_{B1b}$  y  $GABA_{B2}$  (Loh y Ball, 2000; Malgorzata y Malgorzata, 2008).

Los receptores  $GABA_B$  se han identificado tanto en el SNC como en el SNP. Dentro del SNC, los receptores  $GABA_B$  son en su mayoría localizados en neuronas de los núcleos talámicos del cerebelo, la amígdala y la corteza. Una concentración considerable de estos receptores también ha sido detectada en el hipocampo, la habénula, la sustancia nigra, el área tegmental ventral, núcleo accumbens, el globo pálido y el hipotálamo. Otros estudios revelaron que los receptores  $GABA_B$  también se expresan en la médula espinal (asta ventral y dorsal). Es importante destacar que el patrón de distribución de las subunidades  $GABA_{B1}$  y  $GABA_{B2}$  en muchas estructuras del SNC es similar, a excepción de la baja expresión del ARNm para  $GABA_{B2}$  en los ganglios basales (núcleo caudado, putámen), el hipotálamo, bulbo olfatorio y la médula espinal. A nivel periférico, los receptores  $GABA_B$  se producen en los ganglios autónomos, en el bazo, la vejiga, el intestino delgado, los pulmones, los testículos, el estómago, el páncreas, el riñón, el hígado, el miocardio y músculos esqueléticos (Malgorzata y Malgorzata, 2008).

#### **2.4 - Papel de los neurotransmisores en el neurodesarrollo embrional.**

Para responder la pregunta planteada en esta tesis, en relación a dilucidar si las BZDs pueden generar un cambio en la conducta del animal adulto cuando son administradas durante el desarrollo prenatal, es necesario conocer el papel de los neurotransmisores en el desarrollo prenatal, las exposiciones a BZDs y sus principales efectos en el desarrollo. En este contexto los neurotransmisores cumplen con funciones importantes en el desarrollo neuronal y de circuitos cerebrales, ya que estudios que comenzaron hace casi 50 años demostraron que los neurotransmisores aparecen mucho

antes de que se formen las sinapsis, por lo que se han postulado varios roles de los neurotransmisores en los procesos del neurodesarrollo, aunque no todos han sido demostrados, algunos ejemplos de tales funciones no-sinápticas son: la dopamina regula la cinética del ciclo celular progenitor y el crecimiento dendrítico (Ohtani, et al. 2003; Song, et al. 2002), la serotonina modula la proliferación celular (Bonnin, et al. 2007), el GABA es una de las primeras sustancias que aparecen en el desarrollo cerebral de los roedores, ejerce una acción trófica en el desarrollo de neuronas monoaminérgicas en el tallo cerebral a través de la interacción con el receptor GABA<sub>A</sub> y activa la migración de las neuronas en desarrollo (Liu, et al. 1997; Behar, et al. 2000) y el glutamato regula la supervivencia de los precursores de los oligodendrocitos (Brazel, et al. 2005).

Humano	Ratón	Eventos del Neurodesarrollo	Desarrollo del sistema de neurotransmisión
34 S -36M	P2-P21	 <p>CTX</p> <p>Sinaptogénesis (ajuste local)</p>	Patrón cortical establecido para NA, 5-HT, DA, GABA y glutamato
		 <p>Aff</p> <p>Diferenciación Bioquímica</p>	
24-28 S	E18-P7	 <p>CP</p> <p>Establecimiento de la topografía</p>	Inervación de las interneuronas GABAérgicas y neuronas de proyección Glutamatérgicas
		 <p>Aff</p> <p>Muerte Celular</p>	
22-34 S	E16-P0	 <p>CP</p> <p>Agrupación</p>	Inervación de las neuronas del VTA, LC y rafé
		 <p>SP</p> <p>Aparición de proyecciones transitorias</p>	
8-15 S	E16-P0	 <p>Aff</p> <p>Agrupación</p>	Generación y migración de las interneuronas de la GE y proyecciones neuronales del pálido
		 <p>MZ</p> <p>Migración</p>	
5 S	E11-17	 <p>PZ</p> <p>Proliferación Muerte Celular</p>	Generación neuronal del LC, VTA y rafé.

**Figura 9 - Eventos del desarrollo y ontogenia que son blancos de la administración de drogas.** En esta imagen se esquematizan los periodos críticos de los principales eventos del neurodesarrollo referentes al desarrollo de los sistemas de neurotransmisión, que incluyen la aparición de receptores, transportadores y la maquinaria de síntesis. Hay que tener en cuenta que algunos de estos elementos de neurotransmisión pueden continuar madurando en la pubertad. La edad de desarrollo en que se dan los principales eventos del desarrollo de los sistemas de neurotransmisión en ambos el humano y el ratón es comparada en las primeras dos columnas del extremo izquierdo de la figura a manera de línea del tiempo. Finalmente, se muestran en la columna de la derecha los principales objetivos farmacológicos (receptores, transportadores, estructuras cerebrales etc) en el neurodesarrollo que pueden afectar diversos aspectos de la conducta tanto del humano como de los roedores.

Abreviaturas: serotonina (5-HT: 5-hidroxitriptamina), noradrenalina (NA), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), dopamina (DA), placa cortical (CP), subplaca (SP), zona proliferativa (PZ), zona marginal (MZ), corteza (CTX), eminencia ganglionar (GE), locus ceruleus (LC), área tegmental ventral (VTA), aferencias (Aff), día embrionario. (E), días postnatales (P), semanas (S) Meses (M). Imagen tomada de Rakic, 1995; Thompson et al. 2009.

Las drogas psicoactivas modulan receptores, transportadores y otros componentes implicados en una neurotransmisión, muchos de estos componentes son

expresados durante periodos prenatales del desarrollo cerebral, aunque en este caso sus patrones de expresión y las funciones son a veces muy diferentes de los roles más típicos que tienen en las etapas tardías en la vida. Así, la presencia de estas proteínas en el desarrollo cerebral, subyacen al impacto bien documentado de la exposición prenatal de drogas en la arquitectura del cerebro, la química y la función neuroconductual en seguimientos clínicos y modelos animales (Thompson, et al. 2009).

La línea del tiempo de hitos del desarrollo neurológico se ha documentado en seres humanos y para la mayoría de los animales utilizados como modelos, por lo tanto, el diseño de modelos animales expuestos a drogas durante determinadas etapas del desarrollo fetal se puede correlacionar con el tiempo de exposición durante el embarazo humano, al menos en una primera aproximación (fig. 9; Clancy, et al. 2001).

#### **2.4.1 – Efectos sinápticos de las exposiciones prenatales a BZDs.**

El GABA es uno de los primeros neurotransmisores que aparecen en el desarrollo cerebral de los roedores y ejerce una acción trófica en las neuronas monoaminérgicas en el tallo cerebral a través de la interacción con el receptor GABA<sub>A</sub>, consistentemente con esta interpretación los antagonistas GABAérgicos (como la bicuculina) tienen un efecto negativo en el desarrollo de las neuronas monoaminérgicas (Liu, et al. 1997). Estos datos realzan la posibilidad de que una exposición prenatal a drogas que actúen en los receptores GABA<sub>A</sub>, pueden interferir positiva o negativamente la influencia regulatoria del GABA en el desarrollo cerebral, además de producir desbalances en las neurotransmisiones monoaminérgicas y GABAérgicas, estos efectos tienen consecuencias funcionales y conductuales en los animales a largo plazo.

Algunos aspectos del funcionamiento del sistema GABAérgico pueden ser modificados por factores tanto prenatales como posnatales, los cuales pueden alterar la función de este sistema de neurotransmisión en regiones cerebrales específicas, de ahí que puedan influenciar el curso normal del desarrollo neuronal y conductual de las crías en mamíferos (kellogg, et al. 1993; Liu, et al. 1997; Kellogg, 1999). La exposición en animales experimentales a BZDs en la etapa prenatal, ha sido claramente asociada a teratogenicidad (malformaciones cardiacas), con alteraciones en las respuestas conductuales, neurales, hormonales y respuestas inmunes a estresores ambientales, además la exposición a BZDs da como consecuencia un retraso en el desarrollo, *con mayores efectos después del comienzo de la pubertad mucho después de que el fármaco*

*ha sido eliminado del organismo* (kellogg, et al. 1993; Kellogg, 1999; Cannizzaro, et al. 1995, 2001, 2002, 2005).

Estudios controlados con tratamientos prenatales de Dz en ratas, han encontrado cambios a largo plazo en la función del receptor GABA<sub>A</sub> en el tallo cerebral, el hipocampo y la corteza cerebral, en particular estos han sido descritos como una disminución en el número de sitios de unión para BZDs y para GABA (atenuando el efecto farmacológico de los agonistas GABAérgicos en el canal de Cl<sup>-</sup>), una disminución en la expresión del ARNm para receptores GABA<sub>A</sub> (Cannizzaro, et al. 2005). Además, la exposición prenatal de BZDs en ratas, durante el desarrollo ontogénico del cerebro, resulta en un decremento en la maduración y una disminución en la función de los receptores GABA<sub>A</sub>, así como una disminución en la expresión de subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\gamma 2$ . Estos cambios repercuten en alteraciones conductuales y en la incapacidad de estos animales para adaptarse a los desafíos ambientales (Cannizzaro, et al. 2002; Picard, et al. 2008).

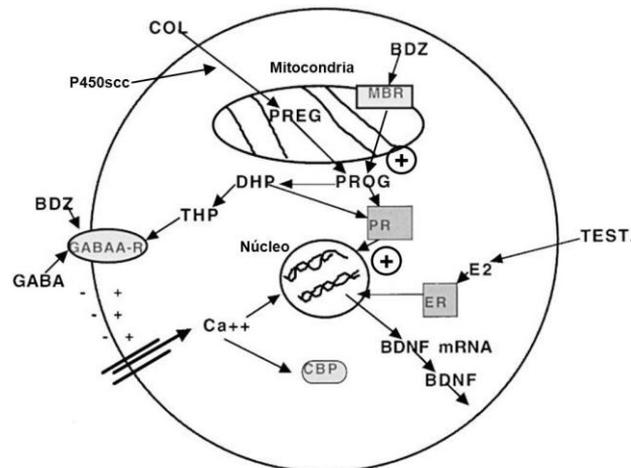
La exposición crónica de las BZDs durante la gestación de la rata, sugiere que se producen alteraciones en las respuestas hacia los estresores ambientales en estos animales a una edad adulta (por ejemplo generando un incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona y prolactina ante estresores ambientales), así como generando cambios en la liberación de noradrenalina en el hipotálamo y de dopamina en la corteza prefrontal (Kellogg, et al. 1993; Cannizzaro, et al. 2001, 2002, 2005).

La mayoría de las alteraciones conductuales probadas por los tratamientos con Dz gestacional aparecen después de la pubertad en el macho, lo que sugiere que las hormonas pueden jugar un papel fundamental (Kellogg, 1999), dentro de estas alteraciones se han reportado disfunciones en la conducta reactiva, en la conducta ansiosa, en la interacción social, en el aprendizaje y memoria, así como en procesos asociativos y motivacionales (Simmons, et al. 1984; Cannizzaro, et al. 1995, 2002) esto sugiere que la exposición prenatal a Dz puede interferir con la capacidad del animal adulto para procesar la información de su medio ambiente.

#### **2.4.2 - Mecanismos implicados en la administración prenatal de Dz**

Aún no se conocen los mecanismos mediante los cuales el Dz ocasiona un cambio en el sistema GABAérgico durante la etapa prenatal, Kellogg en 1999 descubrió una evidencia que indica, que los receptores GABA<sub>A</sub> de las neuronas en desarrollo poseen sitios de reconocimiento para diversas hormonas esteroideas, en particular los

metabolitos 5- $\alpha$  reducidos como la desoxicorticosterona, la progesterona y la testosterona, dichos esteroides han demostrado actuar como moduladores positivos de los receptores GABA<sub>A</sub>. Por ello, se propone que exposición prenatal a Dz altera la función del receptor GABA<sub>A</sub> en animales adultos, y algunos de los efectos reportados están relacionados al género (por ejemplo; se han encontrado alteraciones en la sensibilidad cortical de los receptores GABA<sub>A</sub> en machos adultos expuestos a Dz in útero, en contraste esto no fue observado en las hembras). Además, la acción del Dz en los receptores GABA<sub>A</sub> in útero podría afectar también la diferenciación neuronal y el crecimiento, con consecuencias específicas del género, que afectan la expresión de otros factores tróficos.



NEURONA EN DESARROLLO

**Figura 10 - Mecanismos de acción del Dz en el desarrollo de las neuronas.** No todos los mecanismos descritos necesariamente están presentes en cada neurona. El Dz puede interactuar con el receptor GABA<sub>A</sub> en el que podría alterar la acción despolarizante del GABA en las neuronas en desarrollo. La estimulación GABAérgica en cultivos se ha asociado con un aumento el flujo de cloro (Cl<sup>-</sup>) al exterior e indirectamente calcio (Ca<sup>2+</sup>) al interior y un aumento en los niveles de ARNm para BDNF. El calcio puede influir en la transcripción de genes a través de varias rutas. El dimorfismo sexual de esta vía de interacción se da a partir de: 1) la distribución de dimorfismo sexual de las proteínas de unión de calcio específicas [CBP] ó, 2) la presencia de testosterona (TEST) sexo-específica, que puede ser aromatizada a estradiol [E2,]. El E2 formado por la unión de la testosterona al receptor de estrógenos (ER), pueden influir la transcripción del ARNm para BDNF. El Dz también se une a los receptores mitocondriales de BZD (MBR). La estimulación del MBR afecta la síntesis de esteroides en el cerebro, este proceso puede estar teniendo lugar en neuronas durante el desarrollo temprano. La DHP pueden unirse a receptores de progesterona (PR) e influenciar de la transcripción de genes. Otras abreviaturas: colesterol (COL), pregnanolona (PREG), progesterona (PROG). Imagen tomada de (Kellogg, 1999).

El GABA ejerce un efecto regulatorio en los mecanismos de crecimiento y organización neuronal en el tallo cerebral (Liu et al., 1997; Liu et al., 1998), hipotálamo (Deng et al., 2007), hipocampo, estriado y corteza cerebral (Kellogg, 1999; Liu et al., 2009) por medio de los receptores GABA<sub>A</sub> y los receptores mitocondriales a BZDs (o también denominados receptores periféricos), estos últimos considerados los

mediadores en los efectos retardados al Dz prenatal (fig. 10), cuya función es incrementar el transporte de colesterol al interior de la membrana mitocondrial para la formación de pregnanolona por el complejo enzimático citocromo P450 (Martín-García et al., 2007).

El GABA tiene una influencia trófica en el desarrollo cerebral, por lo que la presencia de Dz en el cerebro fetal afecta negativamente la influencia trófica del GABA. También se ha documentado que el GABA puede ejercer influencias despolarizantes en las neuronas en desarrollo, en contraste con su acción predominante que es de hiperpolarización en el cerebro maduro. La acción despolarizante del GABA en las neuronas en desarrollo promueve la salida  $\text{Cl}^-$  en las células. Por lo tanto, ya que el GABA puede ejercer una gran influencia sobre la excitabilidad neuronal y el control de las corrientes iónicas durante el desarrollo cerebral, lo que convierte a esta neurotransmisión en un factor crítico en la regulación de la diferenciación neuronal, por lo tanto la modulación de los receptores GABA ( $\text{GABA}_A$  y mitocondriales a BZDs) pueden influir en el crecimiento y conexión neuronal (Kellogg, 1999).

El Dz también se une al receptor mitocondrial a BZDs (fig. 10), un sitio que se ha asociado con la regulación de la esteroidogénesis (facilitando el flujo de colesterol al interior de la mitocondria) en varios órganos. El cerebro tiene la capacidad de sintetizar nuevos esteroides a partir del colesterol, la evidencia reciente indica que el complejo enzimático P450<sub>scc</sub> es esencial para la conversión de colesterol a pregnanolona (el precursor de la progesterona y de la dehidroepiandrosterona), la cual ha sido identificada en el SNC y SNP durante la embriogénesis (Kellogg, 1999). La enzima 5 $\alpha$ -reductasa, es la responsable de la conversión de esteroides como la progesterona y la testosterona a sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, que se han observado en zonas germinales y campos de diferenciación durante el desarrollo fetal del tallo cerebral, hipotálamo, hipocampo, estriado y corteza cerebral en la rata (Liu et al., 1997; Liu et al., 1998; Kellogg, 1999; Deng et al., 2007; Liu et al., 2009). Considerando en conjunto, estas observaciones se ha sugerido que la formación sincronizada de hormonas y neuroesteroides precursores 5 $\alpha$ -reducidos pueden tener lugar en neuronas en desarrollo, en lugar de la glía como es típico en el cerebro adulto. Por último, los fármacos que actúan en los receptores mitocondriales a BZDs influyen la génesis de nuevos neuroesteroides, facilitando el flujo intramitocondrial de colesterol. La presencia de Dz durante el desarrollo fetal podría afectar la esteroidogénesis del cerebro (en lugar de la

esteroidogénesis gonadal), que a su vez, podría afectar los niveles de esteroides  $5\alpha$ -reducidos, potentes moduladores de la función del receptor GABA<sub>A</sub> (Kellogg, 1999).

## 2.5 - Drogadicción.

Para esta tesis es necesario abordar el tema de las adicciones a drogas desde una perspectiva social, farmacológica y fisiológica, por lo que en los siguientes capítulos se hará una descripción conceptual de la adicción, el mecanismo de acción de las drogas, las principales vías neurales implicadas en el reforzamiento, así como en los cambios fisiológicos tras la administración crónica de drogas en el sistema mesolímbico dopaminérgico.

La drogadicción es un desorden crónico recurrente que se define por dos características principales: 1) una compulsión por tomar una droga, así como conductas dirigidas para su consumo y 2) una pérdida del control en la limitación de la ingesta (APA, 1994; OMS 1992). Las drogas de abuso actúan en sitios locales de la membrana celular, dentro de los sistemas neuroquímicos que forman parte de las vías del sistema de recompensa, el principal es el sistema dopaminérgico del cerebro medio, el cual tiene un papel fundamental no sólo en los sistemas de recompensa y control motor, sino también en las funciones de orden superior; incluidas la cognición y la memoria. Los péptidos opioides han sido implicados en el procesamiento emocional en todo el neuroeje (Koob y Le Moal, 2001).

Por lo general, las drogas adictivas pueden actuar como reforzadores positivos (produciendo euforia) o como reforzadores negativos (aliviando síntomas de abstinencia o de disforia). Además, los estímulos ambientales (señales) son asociados con el consumo de drogas, en sí también puede inducir una respuesta condicionada (retirada o deseo) en ausencia de la droga (Spanagel y Weiss, 1999); con el uso continuo de las drogas se inducen cambios adaptativos en el SNC, se presenta la tolerancia, dependencia física, sensibilización, el *craving* (anhelo/compulsión) y recaídas farmacológicas, es necesario conocer las definiciones de los adjetivos y procesos anteriores para la comprensión y el diagnóstico de una adicción farmacológica (tabla 2).

<b>Tabla 2.- Definiciones de los términos más usados en el estudio de adicciones.</b>	
<i>Craving</i> (anhelo/compulsión)	Antes este concepto era conocido como dependencia psicológica y es definido como un intenso deseo de volver a experimentar los efectos de una sustancia psicoactiva. El <i>craving</i> es una causa de recaída después de largos períodos de abstinencia.
<i>Priming</i> (Sublimación)	Se refiere a una nueva exposición de una sustancia, de la cual anteriormente el sujeto abuso. Esta exposición puede precipitar una rápida reanudación del abuso.
Recaída	Este concepto se refiere una reanudación en la conducta de búsqueda de alguna droga, o el consumo de alguna droga después de un período de abstinencia. El <i>Priming</i> , las señales ambientales (personas, lugares o cosas asociadas con el uso de drogas en el pasado), y el estrés pueden desencadenar el deseo intenso y causar una recaída.
Recompensa	Es un estímulo que el cerebro interpreta como intrínsecamente positivo o como algo que hay que alcanzar para generar placer.
Sensibilización	Este término se refiere al aumento en el efecto esperado de un fármaco tras la administración repetida (por ejemplo, el aumento de la activación del aparato locomotor después de la administración de psicoestimulantes). La sensibilización también se refiere a la hipersensibilidad persistente, para el efecto de un fármaco en una persona con antecedentes de exposición a drogas (o al estrés). La sensibilización es uno de los mecanismos neurobiológicos implicados en el <i>craving</i> y en la recaída.
Abuso de Sustancias	Se caracteriza por las consecuencias adversas recurrentes y relacionadas clínicamente con el uso repetido de sustancias, como es el incumplimiento de las obligaciones principales, uso de drogas en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso, la aparición de problemas legales relacionados con las drogas y el uso continuo de drogas a pesar de la presencia de problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes.
Dependencia a Sustancias	Es un conjunto de síntomas cognitivos, conductuales y fisiológicos que indican que una persona continua con el consumo de una sustancia a pesar de tener problemas clínicamente significativos relacionados con el uso de sustancias. Para ser diagnosticada una dependencia a sustancias, la Asociación Americana de Psiquiatría (APA), requiere que el paciente deba cumplir con al menos tres de los siguientes criterios; 1) síntomas de tolerancia, 2) síntomas de abstinencia, 3) uso de una sustancia en dosis superiores a las terapéuticas o durante períodos más largos de los prescritos o previstos, 4) deseo persistente o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el consumo, 5) gasto de tiempo considerable en los esfuerzos para obtener la sustancia, 6) una reducción de actividades sociales, laborales o recreativas importantes debido al consumo de drogas y 7) el uso continuo de una sustancia descuidando la atención a su salud, la socialización, o tener problemas económicos.
Síndrome de Abstinencia	Este término engloba un conjunto de signos y síntomas que siguen a la interrupción brusca o reducción en el uso de una sustancia o después de la obstrucción de las acciones de una sustancia por antagonistas (por ejemplo, la naloxona en la adicción a heroína). El síndrome también puede ser producido por las señales asociadas con el consumo de sustancias (abstinencia condicionada). Los síntomas tienden a ser lo opuesto a los producidos después de la exposición a corto plazo a un fármaco. La abstinencia es una de las causas del consumo compulsivo de las drogas y de recaídas a corto plazo.

**Tabla 2** - La columna de la izquierda refiere los términos usados en clínica para el diagnóstico de un paciente con drogadicción, mientras que en la columna de la derecha se hace referencia a las definiciones de dichos términos (tomada de Camí y Farré, 2003).

También algunos investigadores han hecho hincapié en la disociación entre el valor incentivo de la droga y sus efectos placenteros o hedónicos, para que el sistema cerebral esté implicado en el mecanismo de recompensa debe volverse hipersensible a los efectos directos de la droga y a los estímulos asociados que no son directamente atribuibles a la misma, esta hipersensibilización causa deseo y *craving*, independientemente de la presencia de síntomas de abstinencia y conducen a un comportamiento compulsivo de búsqueda y consumo de drogas. Aunque las sensaciones agradables disminuyen progresivamente, las drogas se vuelven patológicamente deseables (Robinson y Berridge, 2001; Robinson y Berridge, 2003; Robinson y Berridge, 2008). Por último, las conductas compulsivas de búsqueda y consumo de drogas se ven facilitadas, por la dificultad en la toma de decisiones y en la capacidad de realizar juicios de las consecuencias de las propias acciones, estas dificultades cognitivas se han relacionado con un déficit en la activación de la corteza prefrontal (Goldstein y Volkow, 2002), además de una sobreactivación de los mecanismos de memoria y de reforzamiento adictivo (Hyman y Malenka, 2001).

### **2.5.1 - Drogadicción y alostasis.**

Los mecanismos neurobiológicos de la adicción son complejos y aún no han sido completamente evidenciados ya que, la conducta involucra diversos sistemas de neurotransmisión, así como diversas estructuras cerebrales y ocasiona cambios plásticos en estos, por lo que diversos investigadores han hecho teorías acerca del origen y desarrollo de la adicción. Los hallazgos realizados por Koob y Le Moal han propuesto que el organismo intenta contrarrestar los efectos de una droga, dados por un círculo vicioso en el cual, el *set point* hedónico (el punto en el que el placer es alcanzado), cambia continuamente en respuesta a la administración de una sustancia. Además sugieren que la drogadicción resulta de la desregulación del mecanismo de recompensa y alostasis (capacidad de lograr la estabilidad a través del cambio subsecuente; Koob y Moal, 1997; Koob y Le Moal, 2001).

La homeostasis corresponde a mecanismos que mantienen la estabilidad dentro de los sistemas fisiológicos y condicionan a todos los parámetros del medio interno dentro de los límites que permiten a un organismo sobrevivir. En este contexto la homeostasis es un proceso de auto-regulación para el sostén de parámetros corporales en torno a un punto de referencia fundamental para la supervivencia. En contraste la

“alostasis” propone el mantenimiento de una estabilidad del sistema fuera de los rangos homeostáticos normales, esto se refiere al concepto fisiológico donde un organismo debe variar todos los parámetros de su medio interno y repartirlos de manera apropiada, para percibir y anticipar las demandas ambientales crónicas con el fin de mantener una estabilidad, es decir, si las demandas al sistema continúan produciendo un desequilibrio, el proceso de alostasis sigue regulando que el organismo movilice enormes cantidades de energía para mantener una estabilidad aparente en un estado patológico “*set point*”. Por ejemplo: cuando una persona se somete a estrés se producen ciertas respuestas autónomas, induciendo un aumento en la liberación de neurotransmisores promotores de vigilancia, aumento en la frecuencia cardíaca, entre otras. Pero cuando este estado se hace crónico dichas respuestas también se prolongan, promoviendo un estado de alostasis y modificando el “*set point*” para estas respuestas (McEwen y Stellar, 1993; Koob y Le Moal, 2001).

Cuando el organismo ha alcanzado un estado de alteración tan grave, que no puede recuperarse mediante la movilización de sus propios recursos, la alostasis ha llegado a un punto que normalmente se considera como una enfermedad. El estado de la desregulación en el sistema de recompensa puede producir la pérdida del control en el consumo de drogas, uso compulsivo o adicción a las drogas (Koob y Moal, 1997). Dicha teoría podría explicar la vulnerabilidad a desarrollar una adicción a drogas en ciertas poblaciones que cursan con diversos trastornos psiquiátricos como la depresión, la ansiedad, el estrés crónico o la esquizofrenia.

### **2.5.2 - Neurocircuito del reforzamiento**

Una adicción se desarrolla por cambios neuroquímicos y fisiológicos, las investigaciones realizadas en este sentido, apuntan al sistema dopaminérgico como una pieza clave en el desarrollo y mantenimiento de conductas reforzantes, por lo que a continuación se describirán los aspectos generales de la neurotransmisión dopaminérgica, así como las principales estructuras implicadas en la evaluación de los estímulos reforzantes.

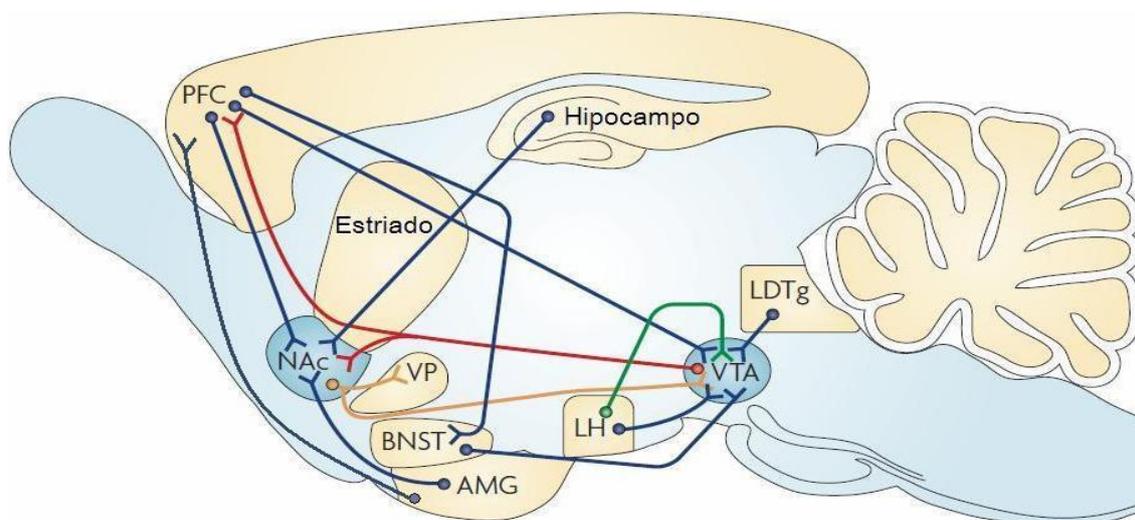
La dopamina se sintetiza a partir de la l-tirosina, la cual es transformada por medio de la enzima tirosina hidroxilasa a l-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y esta a su vez es transformada por la DOPA-descarboxilasa a dopamina (Brailowsky, 1995; Kandel, et al., 2000). La dopamina al ser liberada, se une a receptores metabotrópicos los cuales están divididos en dos familias: la primera familia está comprendida por los

receptores D1 y D5, los cuales están acoplados a proteínas Gs y ejercen un efecto excitatorio en la enzima adenilato-ciclase, la cual incrementa los niveles intracelulares de AMPc. La segunda familia de receptores dopaminérgicos está compuesta por los receptores D2, D4 (postsinápticos) y D3 (presinápticos), que están acoplados a proteínas Gi, las cuales inhiben a la enzima adenilato-ciclase, cabe resaltar que los receptores D1 son aproximadamente 10 veces más sensibles a la dopamina que los D2. Finalmente, la dopamina puede ser recapturada, puede ocupar autorreceptores (D3) o puede ser metabolizada por la enzima monoamino-oxidasa (Brailowsky, 1995; Pellicer, et al., 2009).

Todo estímulo neutro es evaluado por ciertas estructuras cerebrales (hipocampo, amígdala y corteza prefrontal), las cuales determinan el valor de dicho estímulo que puede ser reforzante o aversivo, por lo que la descripción de estas estructuras cerebrales es necesaria para comprender el fenómeno de la adicción. Las vías neuronales implicadas en la drogadicción están compuestas por el sistema mesocorticolímbico (fig. 11), originado en neuronas del área tegmental ventral (sitio de los cuerpos celulares dopaminérgicos) y el núcleo accumbens (Camí y Farré, 2003; Koob y Volkow, 2010). Algunas drogas de abuso tienen una acción sobre este sistema mesocorticolímbico a diferentes niveles, por lo tanto, no es sorprendente que la evidencia acumulada a lo largo de la última década demuestre, que las drogas de abuso pueden influir en los mecanismos de plasticidad sináptica de los circuitos cerebrales implicados en el refuerzo y el procesamiento de la recompensa, de hecho, una hipótesis influyente es que la adicción representa una forma patológica potente, de aprendizaje y memoria (Hyman y Malenka, 2001; Kalivas y Volkow, 2005; Hyman, et al. 2006).

El circuito mesolímbico del reforzamiento incluye proyecciones de cuerpos neuronales desde el VTA a estructuras límbicas las cuales incluyen el NAc implicado en los efectos reforzantes (evaluación de estímulos), amígdala la cual está implicada en los cambios emocionales y motivacionales del síndrome de abstinencia e hipocampo el cual ha sido relacionado con procesos de memoria y respuestas condicionadas vinculadas al *craving* (Koob y Le Moal, 2001). En cuanto al circuito mesocortical incluye las proyecciones desde el VTA a la corteza prefrontal, la corteza orbitofrontal y al cíngulo anterior, las cuales están involucradas en la experiencia consciente dada por los efectos de las drogas, el *craving* por las drogas y la compulsión por consumir drogas (Koob y Le Moal, 2001; Di Chiara, 1999). Tanto el circuito mesolímbico como el mesocortical pueden funcionar en paralelo, interactuar entre sí y

con otras áreas cerebrales. La liberación de dopamina a partir de neuronas del VTA aumenta en respuesta a la administración de todas las drogas de abuso, además éstas neuronas también disparan en respuesta a estímulos novedosos y sus patrones de disparo pueden codificar señalizaciones que predicen el valor reforzante de un estímulo, en relación a su valor esperado o a sus expectativas (Kauer y Malenka, 2007).



**Figura 11 - Circuito mesocorticolímbico del sistema de recompensa en la rata.** Esquema simplificado de las principales proyecciones del neurocircuito de la recompensa, destacando las principales aferencias y eferencias del VTA y el NAc. Dentro de los principales neurotransmisores y neuropéptidos implicados en el circuito de la adicción, se pueden observar las proyecciones glutamatergicas (azul), dopaminérgicas (rojo), GABAérgicas (naranja) y orexinérgicas (verde), así como algunas de las principales estructuras implicadas en el circuito de la adicción como son; el área tegmental ventral (VTA), el núcleo accumbens (NAc), la corteza prefrontal (CPF), la amígdala (AMG), núcleo basal de la estría terminalis (BNST), núcleo tegmental laterodorsal (LDTg), hipocampo, hipotálamo lateral (LH) y el pálido ventral (VP) tomada de Kauer y Malenka (2007).

El principal tipo de células en el VTA son las neuronas dopaminérgicas que reciben entradas excitatorias glutamatergicas de la corteza prefrontal, el núcleo tegmental laterodorsal, el núcleo basal de la estría terminalis, el hipotálamo lateral (Omelchenko y Sesack, 2007) y proyecciones orexinérgicas del hipotálamo lateral (Kauer y Malenka, 2007). Las neuronas dopaminérgicas del VTA a su vez ofrecen proyecciones importantes al NAc y a la corteza prefrontal. El NAc además puede recibir proyecciones glutamatergicas de la corteza prefrontal, amígdala e hipocampo. Las neuronas dopaminérgicas del VTA son inhibidas por las interneuronas GABAérgicas desde el pálido ventral y el NAc (figura 12; Hyman y Malenka, 2001; Koob y Le Moal, 2001; Goldstein y Volkow, 2002; Hyman, et al. 2006).

Aún no existe consenso sobre todas las estructuras cerebrales implicadas en el neurocircuito del reforzamiento y la adicción, muchos investigadores siguen encontrando nuevos hallazgos y postulando nuevas estructuras generando una matriz

muy compleja y difícil de estudiar en su conjunto. Podemos resumir que tanto los reforzadores naturales (comer, beber y la actividad sexual), así como las drogas adictivas estimulan la liberación de dopamina en neuronas presinápticas desde el área VTA hacia el NAc y a la corteza prefrontal, causando euforia y reforzamiento de la conducta, pero en el caso de los reforzadores naturales, existe un cambio adaptativo muy rápido o habituación después de algunas experiencias, lo cual ha llevado a pensar que la novedad y lo inesperado juegan un papel muy importante en la respuesta inicial, en tanto que la respuesta a las drogas adictivas no es influenciada por la habituación y cada dosis de la droga estimula la liberación de dopamina, por otra parte, la dopamina media las sensaciones hedónicas de un estímulo reforzante, promueve el aprendizaje asociativo sobre ese estímulo o anticipando sus efectos recompensantes (Di Chiara, 1999; Schultz, 2007). Durante el síndrome de abstinencia asociado a opioides, canabinoides, etanol, psicoestimulantes y nicotina, se ha cuantificado un decremento significativo en los niveles de dopamina en el NAc (Nestler, 2001).

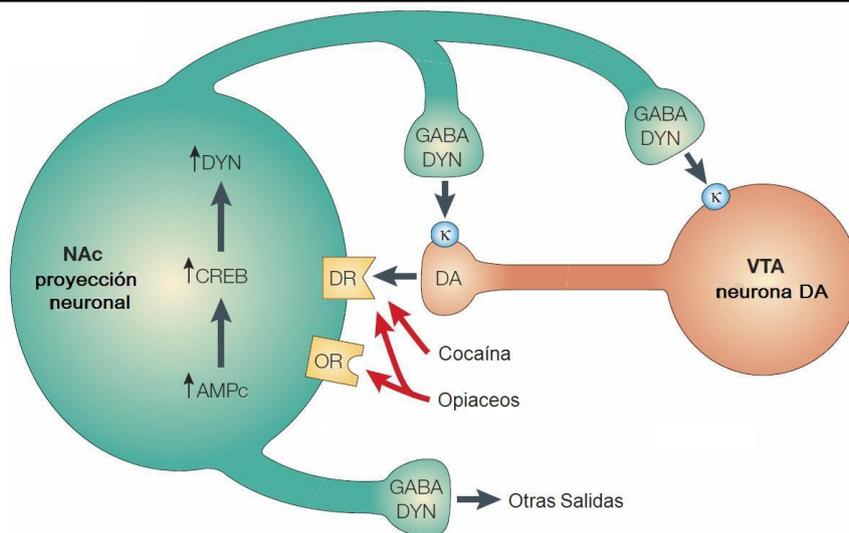
### **2.5.3 - Interacción del NAc en procesos de reforzamiento y aversión.**

La base biológica de los componentes relacionados con el estado de ánimo, como son la recompensa y la aversión, no está bien definida. Las formulaciones clásicas de estos estados implican al sistema mesocorticolímbico en la recompensa, que comprende áreas cerebrales como el NAc, el VTA y la corteza prefrontal. Así como otras áreas cerebrales incluyendo la amígdala, la sustancia gris periacueductal y el locus coeruleus, implicadas a menudo en la aversión, sin embargo, la noción de que ciertas áreas cerebrales de manera rígida y restrictiva median recompensa o aversión (Carlezon y Thomas, 2009).

En este sentido hasta el 35% de las eferencias neuronales del VTA son GABAérgicas, proyectadas desde el pálido ventral y el NAc, por lo que las neuronas dopaminérgicas del VTA son inhibidas por las proyecciones GABAérgicas vía receptores GABA<sub>A</sub> a través del NAc y el pálido ventral (Roitman, et al. 2005). En este contexto, muchas líneas de investigación en electrofisiología soportan la idea de que una inhibición en el disparo del NAc puede relacionarse con un mayor reforzamiento, ya que los estímulos reforzantes producen inhibiciones en el NAc *in vivo*, además, las manipulaciones neurobiológicas que promueven específicamente la inhibición de disparo del NAc parecen aumentar los efectos reforzantes de un estímulo, así como la inhibición de las neuronas de proyección espinosa media (MSNs) e interneuronas

GABAérgicas del NAc, induce en estructuras inferiores señales relacionadas a las cualidades hedónicas de un estímulo (Carlezon y Thomas, 2009). En el NAc, las MSNs constituyen la gran mayoría (90-95%) son inhibitorias, las células restantes son interneuronas colinérgicas y GABAérgicas, dichas subpoblaciones de MSNs se comunican por vías "directas" e "indirectas" con áreas mesencefálicas y subtalámicas, por lo que la inhibición en el disparo de estas áreas generan conductas aversivas (Carlezon y Thomas, 2009; Xia, et al., 2011).

Las MSNs de la vía directa (fig. 12), co-expresan predominantemente receptores a dopamina ( $D_1$ ) y péptidos opioides endógenos (dinorfina), estas neuronas proyectan directamente al mesencéfalo (sustancia nigra/VTA), inhibiendo a las neuronas dopaminérgicas de dichas áreas. Formulaciones tradicionales plantean que las acciones de la dopamina en los receptores  $D_1$ , se acoplan a proteínas  $G_s$  (estimulantes) y esto se asocian a la activación de la adenilatociclasa, las cuales tienden a excitar las MSNs de la vía directa, con esto se espera que una elevada actividad de estas neuronas, provea de un incremento en las entradas GABAérgicas y de dinorfina (un ligando endógeno a receptores opioides  $\kappa$ ), al sistema mesolímbico y una retroalimentación negativa en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Nestler, 2001; Xia, et al., 2011).



**Figura 12 - Las neuronas de proyección espinoza media (MSNs) de la vía directa.** La neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA), son invadidas por proyecciones neuronales GABAérgica del núcleo accumbens, las cuales expresan a su vez dinorfina. La dinorfina (DYN) constituye un mecanismo de retroalimentación negativa en este circuito: la dinorfina, liberada desde las terminales neuronales del núcleo accumbens, actúa sobre los receptores opioides ( $\kappa$ ), ubicados en las terminales nerviosas y cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas para inhibir su funcionamiento. La exposición crónica a cocaína o a opiáceos regula a la alta la actividad de esta curva de retroalimentación negativa, a través de la regulación positiva vía AMPc, la activación de CREB y la liberación de dinorfinas. Abreviaturas: área tegmental ventral (VTA), núcleo accumbens (NAc) dopamina (DA), receptor dopaminérgico  $D_1$  (DR), receptor opioide (OR), dinorfina (DYN), adenosin monofosfato cíclico (AMPc), proteína de unión al elemento que responde al AMPc (CREB) Imagen tomada de (Nestler, 2001).

Por el contrario, las MSNs de la vía indirecta co-expresan predominantemente receptores a dopamina (D2) y el péptido opioide endógeno (encefalina), estas neuronas proyectan indirectamente al mesencéfalo a través de áreas de relevo como son el pálido ventral y los núcleos subtalámicos. La acción de la dopamina en los receptores D2, los cuales están acoplados a proteínas  $G_i$  (inhibitoria), se asocia con una inhibición de la enzima adenilato ciclasa, lo cual tiende a inhibir a las MSNs de la vía indirecta. Con la inhibición de estas neuronas se espera una reducción de las entradas GABAérgicas y de encefalinas (un ligando endógeno a receptores opioides  $\delta$ ) al pálido ventral, una región que normalmente inhibe a neuronas subtalámicas (Tindell, et al. 2004; Tindell, et al., 2006).

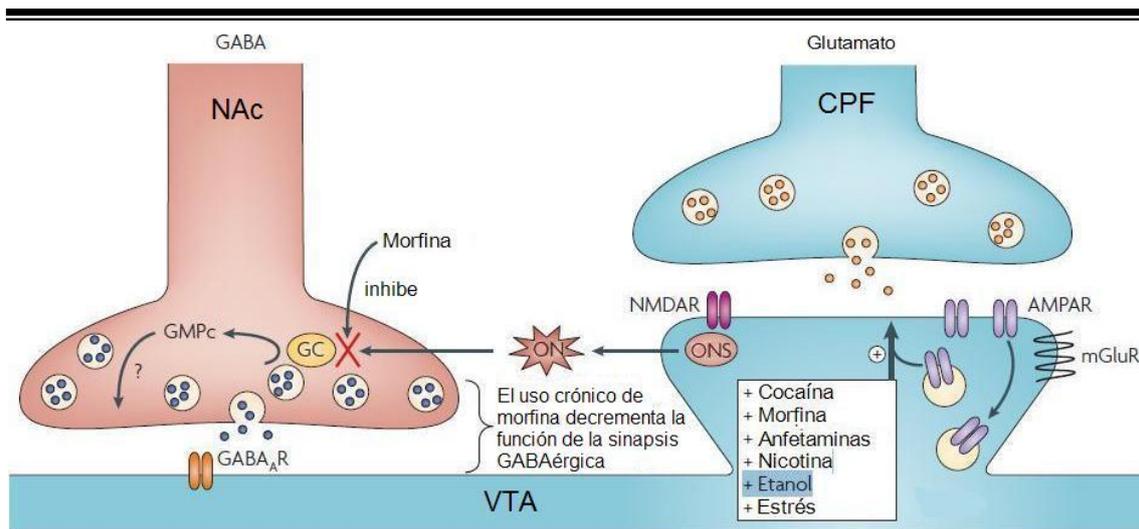
En este contexto, la manipulación genética molecular de las propiedades sinápticas e intrínsecas de membrana, aumentando la excitabilidad de las neuronas del núcleo accumbens puede cambiar la respuesta conductual hacia un estímulo de gratificante por una respuesta de aversión. Por ejemplo, la sobreexpresión de CREB mediada viralmente en el núcleo accumbens produce un aumento en la excitabilidad neuronal de las MSNs. Bajo estas condiciones de mayor excitabilidad en el NAc, los animales muestran una aversión a la cocaína en la prueba condicionamiento de aversión de sitio (fig. 12; Roitman, et al. 2005; Dong, et al. 2006; Wheeler, et al. 2008).

En circunstancias normales, las influencias excitatorias por la acción de los receptores glutamatérgicos (AMPA/NMDA), o la acción de los receptores dopaminérgicos (D1) en el NAc, son mediadas por la acción inhibitoria de los receptores dopaminérgicos (D2). Por lo tanto, la administración de drogas como la cocaína, morfina, los antagonistas NMDA, los antagonistas tipo-L de los canales de  $Ca^{2+}$  o los reforzadores naturales como la comida agradable o el sexo, generan una reducción en la actividad del núcleo accumbens, lo cual reduce la influencia inhibitoria del núcleo accumbens en vías del reforzamiento, esto es directamente proporcional al valor incentivo del estímulo (Carlezon, Jr., y Wise, 1996; Dong, et al. 2006; Wheeler, et al., 2007; Wheeler, et al., 2008).

La exposición repetida a drogas que reducen la actividad de las neuronas del NAc y estrés crónico pueden inducir adaptaciones compensatorias que hacen que el sistema sea más excitable durante la abstinencia, lo que conduce a condiciones caracterizadas por anhedonia o disforia (Todtenkopf, et al., 2006; Dong, et al. 2006; Carlezon y Thomas, 2009).

### 2.5.4 - Cambios plásticos en el sistema mesolímbico dopaminérgico derivados de una exposición crónica a drogas de abuso

Las diferentes clases de drogas de abuso incrementan la liberación de dopamina, por ejemplo: la morfina obtiene su efecto reforzante, en un inicio promoviendo la liberación de dopamina por medio de la acción de los receptores opioides  $\mu$  y por medio de un mecanismo indirecto que disminuye la actividad inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas en el VTA (fig. 13; De Vries y Shippenberg, 2002; Nugent, et al., 2007), las anfetaminas actúan en los transportadores de monoaminas vesiculares y membranales promoviendo la liberación de dopamina (Sulzer, et al., 2005); la cocaína desactiva las proteínas del transportador a dopamina bloqueando así la recaptura de dopamina después de ser liberada (Carlson, 2006). El mecanismo por el cual las BZDs generan adicción tiene nuevas teorías que proponen: la administración crónica de Dz genera una hiperpolarización sostenida de las neuronas GABAérgicas del NAc y en consecuencia se genera una desinhibición de las neuronas dopaminérgicas del VTA lo cual ha sido corroborado mediante la administración de mucimol (agonista GABA<sub>A</sub>) y la subsecuente liberación de dopamina en el VTA (Tan, et al., 2010; Tan, et al., 2011).



**Figura 13 –Modulación de la función y plasticidad sináptica en el área tegmental ventral (VTA) por las drogas de abuso.** La imagen muestra los principales efectos de algunas drogas de abuso, en la plasticidad sináptica del VTA. En la imagen de la derecha se esquematiza una sinapsis excitatoria glutamatérgica entre la corteza prefrontal (CPF) y el área tegmental ventral (VTA), en la que varias clases de drogas de abuso (que se indican en el cuadro blanco), así como el estrés agudo, provocan potenciación a largo plazo (LTP), mediante el aumento de receptores glutamatérgicos postsinápticos AMPA. La activación de los receptores glutamatérgicos NMDA activan la enzima óxido nítrico sintasa (ONS), la cual lleva a la producción de óxido nítrico (ON). El óxido nítrico es un mensajero difuso que se libera de las neuronas postsinápticas (VTA) y activa a la guanilato ciclasa (GC) en las terminales presinápticas inhibitorias provenientes del núcleo accumbens (NAc) representadas en la imagen de la izquierda. Un aumento en el GMPc, provocado por un incremento en la liberación de GABA a los receptores GABA<sub>A</sub> de la neurona postsináptica del VTA. La morfina inhibe la señalización de óxido nítrico a guanilato ciclasa (Carlezon et al., 1997; Malinow y Malenka, 2002; Saal, et al. 2003; Kauer y Malenka, 2007).

El incremento de la liberación de dopamina del VTA al NAc a la corteza prefrontal (Kauer y Malenka, 2007), genera respuestas excitatorias (glutamatérgicas) en la corteza prefrontal formando sinapsis selectivas con las neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan de nuevo a la corteza prefrontal, pero no con las neuronas dopaminérgicas vecinas del VTA que proyectan al NAc (Carr y Sesack, 2000). Las glutamatérgicas en las células dopaminérgicas del VTA expresa una forma de potenciación a largo plazo (LTP) dependiente de receptores NMDA (Bonci y Malenka, 1999).

Investigaciones recientes han encontrado que una sola exposición a cocaína, causa un gran aumento en la proporción de receptores AMPA/NMDA en las neuronas dopaminérgicas del VTA al medirse 24 h después en rebanadas de cerebro. Ensayos adicionales indicaron que este cambio inducido por la cocaína, en la LTP dependiente de receptores NMDA, se debe a una regulación a la alta de los receptores tipo AMPA. Además, se observó que esta LTP inducida por drogas, fue impedida cuando los animales son pretratados con un antagonista de los receptores NMDA (Kauer y Malenka, 2007).

### **III - Justificación**

El Dz es uno de los fármacos más usados clínicamente para tratar tanto trastornos psiquiátricos (ansiedad, compulsiones) como neurológicas (insomnio y epilepsia). En México, el seguimiento así como el registro del consumo de estos fármacos es inexacto, pero se estima de acuerdo con la Encuesta Nacional de Adicciones del INPRFM (2008) que el consumo de tranquilizantes es mayor en mujeres a una edad de entre 26 a 34 años, el cual comprende un periodo reproductivo. El consumo de Dz durante el embarazo induce teratogenicidad. La convergencia entre el consumo de Dz y el embarazo se puede dar por varias causas:

1. Porque en promedio un alto número de los embarazos no son planeados y a menudo estos fármacos son consumidos durante el primer trimestre del embarazo (Austin y Mitchell, 1998; Friedman y Polifka, 2000; Leppée, et al. 2010), además, de acuerdo con los datos recabados por Leppé en 2010, la proporción de mujeres europeas que consumen Dz durante el primer trimestre del embarazo es del 8.3%, durante el segundo trimestre por el 14.2%, durante el tercer trimestre por el 23.7%, durante el postparto estos fármacos son consumidos por el 6%.

2. Por el riesgo que conlleva el retiro abrupto de estos fármacos en las mujeres embarazadas, ya que la gestación es una etapa en la cual se pueden generar severas recaídas en los padecimientos psiquiátricos y neurológicos de base (como el desorden de ansiedad que afecta al 10% de las mujeres embarazadas o en la eclampsia), se pueden producir síndromes de abstinencia más intensos (Marinucci, et al., 2011).

3. Debido a sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, una absorción rápida y completa por el tracto gastrointestinal, tener inicio rápido de sus efectos y atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica alcanzando niveles altos en el cerebro, lo cual incrementa su potencial adictivo por lo que son usualmente preferidas por los pacientes adictos (Roset, et al. 2001; Camí y Farré, 2003; O'Brien, 2005; Rang, et al. 2007).

4. Debido a que se desconoce el factor de un tratamiento crónico a Dz durante el embarazo y la lactancia que predisponga a la siguiente generación a inducir adicción a otras drogas.

Por último, la cada vez más creciente joven población que sufre de alguna adicción se ha convertido en uno de los principales puntos de interés dentro de la agenda del sector salud en México. La justificación de la presente tesis, es estudiar y proponer una variable causal de adicción a un opiáceo. Esto con el propósito de generar mejores estrategias de intervención y prevención de la adicción a drogas como la morfina. Sentando bases para nuevas investigaciones básicas y clínicas y ofrecer mayor conocimiento acerca de las consecuencias del abuso de las BZDs.

#### **IV - Objetivos**

El principal objetivo de la presente tesis es estudiar y correlacionar el uso crónico de Dz en ratas hembras embarazadas, con alteraciones conductuales en las crías de dichas ratas en la edad adulta y si estas modificaciones en la conducta se encaminan a una mayor predisposición de generar adicción a la morfina. Para lo que se plantearon los siguientes objetivos:

1. Cuantificar la conducta de ansiedad en las ratas madre durante la abstinencia en fase inicial inducida por un tratamiento crónico con Dz, comprendiendo los periodos de gestación y lactancia.
2. Identificar un estado de ansiedad en las ratas macho hijos de madres a las que se les administró un tratamiento crónico con Dz.

3. Identificar los cambios en la susceptibilidad de generar crisis convulsivas a través de un antagonista GABAérgico (PTZ), en ratas macho adultos expuestos a Dz durante su desarrollo prenatal y posnatal temprano.
4. Identificar si existe una correlación entre la predisposición o facilitación, para generar una conducta adictiva con una dosis baja de morfina, en ratas macho adultos expuestos a Dz durante su desarrollo prenatal y posnatal temprano.

## **V - Hipótesis**

Este proyecto de investigación propone:

1. La administración crónica de Dz a ratas hembra durante los periodos de embarazo y lactancia, genera un estado de abstinencia caracterizado por ansiedad.
2. La exposición crónica a Dz durante el desarrollo prenatal/neonatal de ratas macho induce a una edad adulta un mayor estado de ansiedad.
3. La exposición crónica de Dz durante el desarrollo prenatal/neonatal de ratas macho favorecerá a una edad adulta un incremento en la susceptibilidad de inducción de crisis convulsivas.
4. Una exposición crónica a Dz durante el desarrollo prenatal/neonatal en ratas macho favorecerá el desarrollo de adicción a la morfina en una edad adulta.

## **VI - MÉTODO**

### **6.1 - Material**

Dentro de este protocolo se usaron diversos materiales los cuales se enlistan a continuación: Comederos de acero inoxidable, jeringas de insulina y guantes de latex.

#### **6.1.1 - Aparatos**

- Báscula OHAUS.
- Balanza Analítica OHAUS.
- Caja de Condicionamiento de Preferencia de Lugar (dimensiones: 60cm largo x 40cm ancho x 20cm alto, la cual consta de tres compartimentos, de los cuales dos son exteriores de 24cm largo x 40cm ancho x 20cm alto, y el compartimento central de 12cm largo x 40cm ancho x 20cm alto).
- Cámara de video SONY HD.
- Computadora de escritorio (con los siguientes softwares: chrono v.0.9<sup>a</sup>, reproductor de medios VLC 1.0.3 golden eye y paquetería office 2007).
- Laberinto Elevado en Cruz (compuesto por 2 brazos abiertos opuestos de 50cm de largo x 10cm de ancho sin paredes y 2 brazos cerrados opuestos de 50cm de largo x 10cm de ancho con paredes de 40 cm de alto, entrecruzados convergiendo en un cuadro central de 10cm<sup>2</sup>).
- Molino marca Estrella.
- Redondel de acrílico transparente.

#### **6.1.2 - Drogas**

- Diazepam (Valium<sup>®</sup>, Roche, en comprimidos.)
- Morfina (Analfin-S.I.<sup>®</sup>, Tecnofarma.)
- Pentilenetetrazol (Sigma-Aldrich, St Lois, MO, U.S.A.)

### **6.2 - Animales**

Los experimentos se realizaron bajo las normas éticas del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) y de la Academia Nacional de Medicina (1999). Para este protocolo se utilizaron en una primera fase: 23 ratas Wistar hembras de 250 a 300 g, alojadas en el bioterio del INPRFM, en cajas individuales de acrílico transparente, las cuales se mantuvieron en un ciclo Luz-Oscuridad de 12-12h

(7:00hrs a 19:00hrs.), con una temperatura constante ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y una humedad de 24 a 25%, con agua ad libitum y fueron habituadas a consumir alimento igual al 3% de su peso corporal en forma de pellets molidos. Para la segunda fase del experimento: se usaron 80 ratas Wistar macho de 200-250 g., las cuales fueron separadas de sus madres a los 68 días posnatales, para ser alojadas en parejas del mismo sexo en un cuarto de habituación con el fin de invertir su ciclo de luz-oscuridad 12-12h (7:00hrs a 19:00hrs) durante 7 días y donde permanecieron durante el resto del experimento.

### **6.3 - Procedimiento.**

Este protocolo se dividió en dos fases, las cuales se describirán a continuación.

#### **6.3.1 - Fase 1 (Administración de Dz y pruebas realizadas a ratas gestantes)**

Para esta primera fase se utilizaron ratas hembras de 250 a 300 g., las cuales fueron inseminadas y divididas en dos grupos aleatoriamente; uno experimental (N=11) integrado por ratas preñadas, las cuales recibieron Dz (10mg/Kg) diariamente durante su gestación y su lactancia. En tanto el grupo control (N=12) fue integrado por ratas inseminadas las cuales no recibieron tratamiento con Dz. A continuación se profundizará en las características de ambos grupos.

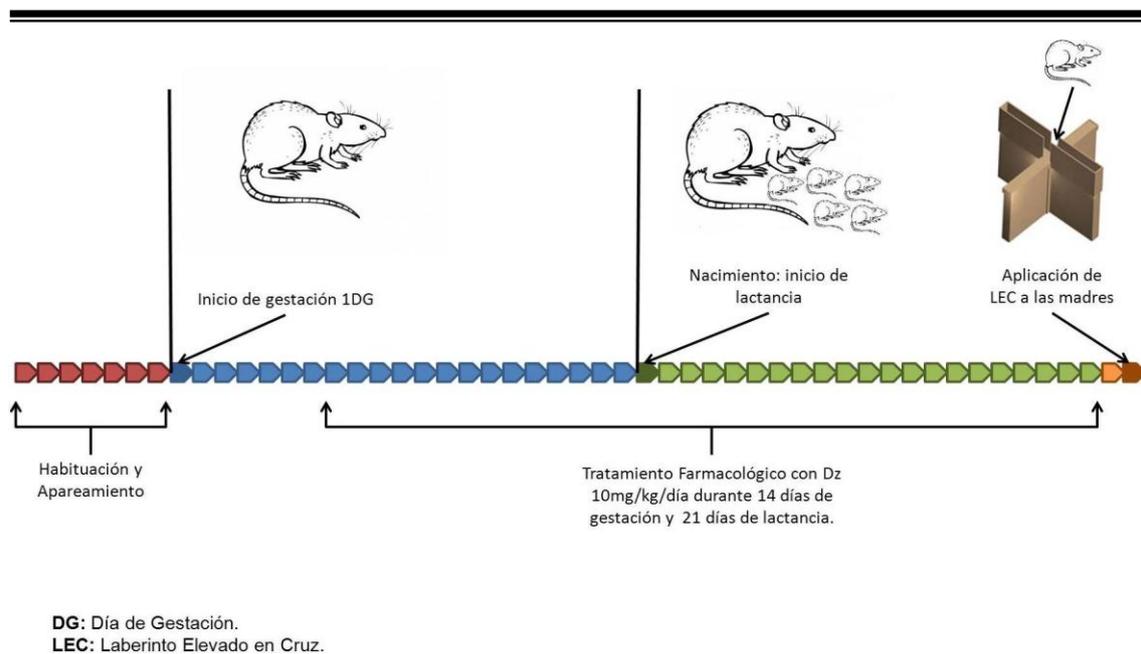
##### *Grupo Experimental (Madres Dz):*

*Cópula:* Al mismo tiempo que las ratas se habituaron a ingerir pellets molidos, fueron apareadas con un macho con el fin de ser inseminadas. Para llevar un control de la inseminación, en el momento en que la rata hembra presentaba el botón seminal se registraba como el día 1 de gestación (1 DG), posterior a esto la rata se mantuvo con el macho por un periodo de 7 días, y al octavo día (8 DG) el macho fue separado de la hembra y esta permaneció en una caja individual.

*Tratamiento Farmacológico:* Las ratas recibieron dosis diaria de diazepam (Valium, Roche) vía oral de 10 mg/Kg, el cuál fue mezclado en su alimento (pellets molidos), el alimento recibido por el animal fue calculado diariamente, suministrando una cantidad igual al 3% del peso corporal del animal. El periodo de tratamiento farmacológico comprendió de 35 días, a partir del día 8 al día 21 de gestación y del día 1 al día 21 de lactancia (Kellogg, 1999; Frieder, et al. 1984; fig. 14). Las ratas que no ingirieran el fármaco diariamente fueron excluidas del protocolo.

*Pruebas:* 2 días posterior a la interrupción abrupta del fármaco, las ratas madres fueron evaluadas con la prueba LEC, con el fin de valorar su perfil ansiogénico (fig. 14).

Posterior a la realización de la prueba, las ratas fueron regresadas con sus crías. 68 días después del nacimiento las crías, los machos fueron separados de sus madres, al ser separadas de las ratas macho, las madres y las ratas hembras del grupo experimental fueron sacrificadas bajo los criterios de ética.



**Figura 14 - Procedimiento realizado en ratas hembras pertenecientes al grupo experimental.** El cual consistió 7 días de habituación y apareamiento (rojo), 21 días de gestación (azul), 21 días de lactancia (verde). El tratamiento farmacológico con Dz se llevó a cabo a partir del día 8 de la gestación hasta el día 21 de lactancia (35 días) finalmente la evaluación conductual de ansiedad con el LEC se llevó a cabo 2 días después de la suspensión del tratamiento de Dz (naranja)

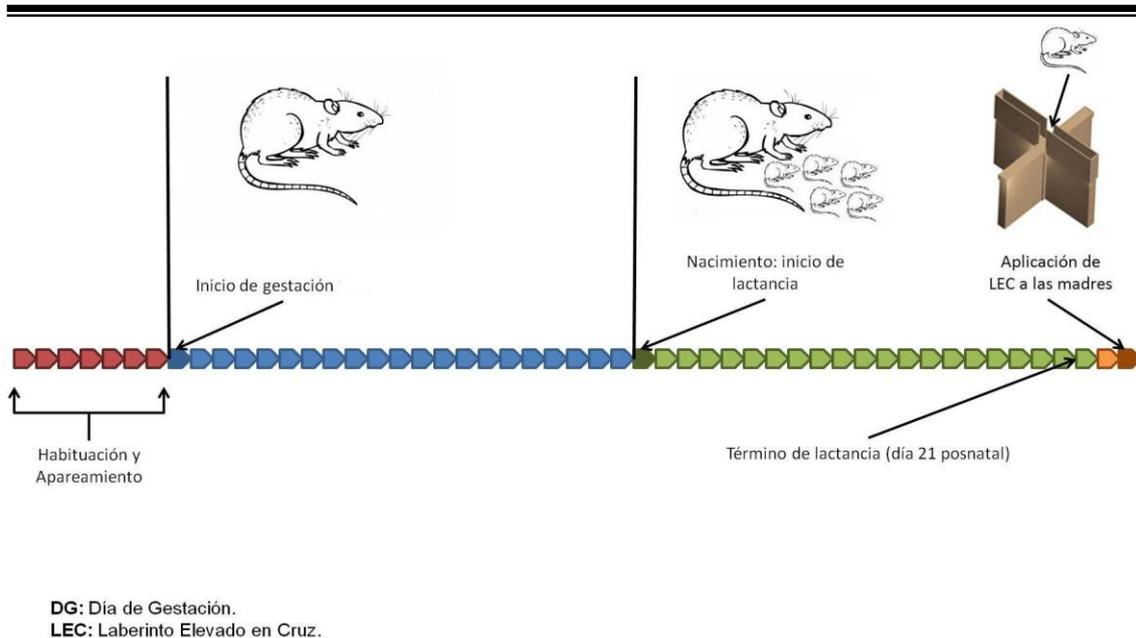
#### *Grupo Control (Madres Control):*

*Cópula:* Al mismo tiempo que las ratas se habituaron a ingerir pellets molidos, fueron pareadas con un macho con el fin de ser inseminadas. Para llevar un control de la inseminación, en el momento en que la rata hembra presentó el botón seminal se registró como el día 1 de gestación (1 DG), posterior a esto la rata se mantuvo con el macho durante un periodo de 7 días, y al octavo día (8 DG) el macho fue separado de la hembra y esta permaneció en una caja individual.

*Tratamiento Farmacológico:* El grupo control no recibió tratamiento farmacológico, solamente se le suministró diariamente pellets molidos en cantidad igual al 3% del peso corporal del animal como única fuente de alimento, así como agua *ad libitum*, por un periodo de 35 días.

*Pruebas:* 23 días posterior al nacimiento de las crías, las ratas madre fueron evaluadas con la prueba LEC, con el fin de valorar su perfil ansiogénico (fig. 15).

Posterior a la realización de la prueba las ratas se regresaron con sus crías y se les separó de ellas hasta el día 68 posterior al nacimiento. Al terminar este periodo las ratas hembra madres fueron sacrificadas.



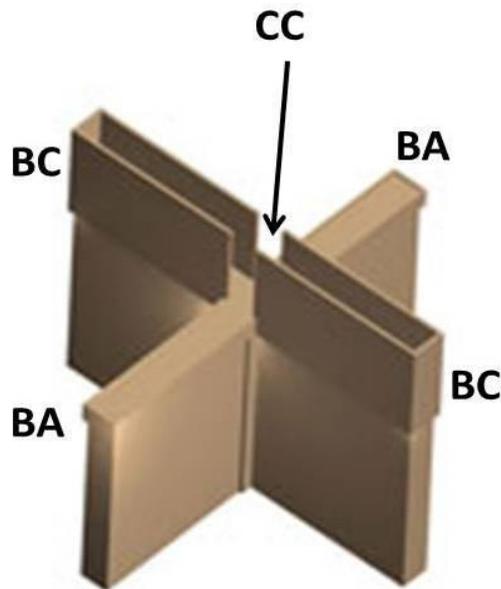
**Figura 15 - Procedimiento realizado en ratas hembras pertenecientes al grupo control.** El cual consistió 7 días de habitación y apareamiento (rojo), 21 días de gestación (azul), 21 días de lactancia (verde), finalmente la evaluación conductual de ansiedad en el LEC se llevó a cabo 2 días después del término de la lactancia (naranja)

### 6.3.2 - Prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC).

El LEC (fig. 16), es utilizado para poder evaluar conductualmente un estado de ansiedad en la rata (Pellow, et al. 1985). Ya que en condiciones normales una rata que presenta ansiedad, tendrá un mayor tiempo de permanencia y un mayor número de entradas a brazos cerrados (BC), en contraste una rata sin ansiedad, las cuales tienen un mayor tiempo permanencia así como un mayor número de entradas a brazos abiertos (BA).

Esta prueba se realizó en una habitación iluminada con luz roja, la tarea consistió en tomar al animal y colocarlo en el cuadro central del laberinto mirando hacia un BA permitiéndole explorar libremente todo el laberinto, durante un periodo de 10 minutos (600 segundos) y esta prueba sólo fue aplicada una vez, para evitar procesos de habituación y/o aprendizaje. Al terminar la prueba el animal fue colocado en su caja con sus crías y cada uno de los brazos del LEC fueron limpiados. Para obtener un registro de la conducta desplegada por el animal, se realizaron grabaciones en video, en las cuales

fueron recabados los siguientes datos: 1) número de entradas a BA y BC, 2) la proporción (%) de entradas a BA y BC y 3) el tiempo total que permaneció el animal en cada BA y BC. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una prueba “ANOVA de dos vías” con el objetivo de descartar un efecto atribuido a las diferencias entre las muestras, en donde el nivel de significancia estadística fue de  $p \leq 0.05$ , cualquier  $p$  mayor a este valor fue considerada como no significativa.



**Figura 16 - EL laberinto elevado en cruz (LEC)**, está compuesto por 2 brazos abiertos (BA) opuestos de 50cm de largo x 10cm de ancho sin paredes y 2 brazos cerrados (BC) opuestos de 50cm de largo x 10cm de ancho con paredes de 40cm de alto. Los BA y BC están entrecruzados convergiendo en un cuadro central (CC) de 10cm<sup>2</sup>, en donde la rata tiene libre acceso a cualquier brazo. El laberinto se encuentra elevado 50cm del piso (Pellow, et al. 1985)

---

---

### **6.3.3 - Fase 2 (Grupos de ratas macho hijos de madres tratadas crónicamente con Dz)**

Para esta fase se utilizaron 91 ratas Wistar macho de 200 a 250 g, las cuales se dividieron en 3 grupos experimentales (integrado por ratas macho productos de madres con tratamiento farmacológico con Dz 10mg/Kg/día, durante 35 días) y 4 grupos controles (compuesto de ratas macho productos de madres sin tratamiento farmacológico con Dz). Estos animales se mantuvieron en todo momento con alimento y agua *ad libitum*. Las ratas macho fueron separadas de sus madres al día 68 después del nacimiento y se alojaron por parejas en un cuarto de habituación con el fin de invertir su ciclo de luz-oscuridad 12-12h (7:00hrs a 19:00hrs) durante 7 días (del día 68 al día 74

posnatal) y a partir del día 75 posnatal se inició la aplicación de las pruebas. A continuación se describirán las características de cada uno de los grupos (Tabla 3).

*Grupo Dz 1 inducción de crisis convulsivas (PTZ 30mg/Kg):* Este grupo se conformó por ratas macho (N=16) productos de madres tratadas con Dz durante 35 días, en las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se les administró una dosis única de PTZ (30 mg/Kg), con el fin de estudiar la susceptibilidad para generar crisis convulsivas.

*Grupo control 1 inducción de crisis convulsivas (PTZ 30mg/Kg):* Este grupo se conformó por ratas macho (N=10) productos de madres sin tratamiento farmacológico, en las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se les administró una dosis única de PTZ (30 mg/Kg), con el fin de estudiar la susceptibilidad para generar crisis convulsivas.

*Grupo Dz 2 condicionamiento conductual (CPL, salina 1ml/Kg):* Este grupo se conformó por ratas macho (N=8) productos de madres tratadas con Dz durante 35 días. En las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se inició la etapa de acondicionamiento (del día 76 al día 80 posnatal) registrando la conducta del animal (pre-tratamiento) en la caja de CPL, a partir del día 81 posnatal las ratas pasaron a la etapa de condicionamiento: se les administró solución salina (1ml/Kg) en forma subcutánea por la mañana y otra aplicación por la tarde durante un periodo de 3 días, finalmente, se cuantificó la conducta de dichos animales (post-tratamiento) en la caja de CPL 24 horas después de la última aplicación (día 84 posnatal).

*Grupo control 2 condicionamiento conductual (CPL, salina 1ml/Kg):* Este grupo se conformó por ratas macho (N=8) productos de madres sin tratamiento farmacológico. En las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se inició la etapa de acondicionamiento (del día 76 al día 80 posnatal) registrando la conducta del animal (pre-tratamiento) en la caja de CPL, a partir del día 81 posnatal las ratas pasaron a la etapa de condicionamiento: se les administró solución salina (1ml/Kg) en forma subcutánea por la mañana y otra aplicación por la tarde durante un periodo de 3 días, finalmente, se cuantificó la conducta de dichos animales (post-tratamiento) en la caja de CPL 24 horas después de la última aplicación (día 84 posnatal).

*Grupo Dz 3 condicionamiento conductual (CPL, morfina 1mg/Kg):* Este grupo se conformó por ratas macho (N=18) productos de madres tratadas con Dz durante 35

días. En las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se inició la etapa de acondicionamiento (del día 76 al día 80 posnatal) registrando la conducta del animal (pre-tratamiento) en la caja de CPL, a partir del día 81 posnatal las ratas pasaron a la etapa de acondicionamiento: se les administró solución salina (1ml/Kg) en forma subcutánea por la mañana y morfina (1mg/Kg) en forma subcutánea por la tarde durante un periodo de 3 días, finalmente, se cuantificó la conducta de dichos animales (post-tratamiento) en la caja de CPL 24 horas después de la última aplicación (día 84 posnatal), esto con el fin de estudiar la adquisición de la adicción a morfina.

*Grupo control 3 acondicionamiento conductual (CPL, morfina 1mg/Kg):* Este grupo fue conformado por ratas macho (N=11) productos de madres sin tratamiento farmacológico. En las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se inició la etapa de acondicionamiento (del día 76 al día 80 posnatal) registrando la conducta del animal (pre-tratamiento) en la caja de CPL, a partir del día 81 posnatal las ratas pasaron a la etapa de acondicionamiento: se les administró solución salina (1ml/Kg) en forma subcutánea por la mañana y morfina (1mg/Kg) en forma subcutánea por la tarde durante un periodo de 3 días, finalmente, se cuantificó la conducta de dichos animales (post-tratamiento) en la caja de CPL 24 horas después de la última aplicación (día 84 posnatal), esto con el fin de estudiar la adquisición de la adicción a morfina.

*Grupo control 4 acondicionamiento conductual (CPL, morfina 5mg/Kg):* Este grupo fue conformado por ratas macho (N=10) productos de madres sin tratamiento farmacológico. En las que fue evaluado su perfil ansiogénico al día 75 posnatal con la prueba de LEC. 24 horas después se inició la etapa de acondicionamiento (del día 76 al día 80 posnatal) registrando la conducta del animal (pre-tratamiento) en la caja de CPL, a partir del día 81 posnatal las ratas pasaron a la etapa de acondicionamiento: se les administró solución salina (1ml/Kg) en forma subcutánea por la mañana y morfina (5mg/Kg) en forma subcutánea por la tarde durante un periodo de 3 días, finalmente, se cuantificó la conducta de dichos animales (post-tratamiento) en la caja de CPL 24 horas después de la última aplicación (día 84 posnatal), esto con el fin de estudiar la adquisición de la adicción a morfina.

Las diferencias en el número de animales utilizados en los grupos han sido consecuencia directa de la exclusión de sujetos, así como la variabilidad en el número de crías macho por camada.

Tabla 3.- Grupos de ratas macho para la Fase 2					
Grupos	Procedimiento				
	68-74 (DP)	75 (DP)	76 (DP)	81-83 (DP)	84 (DP)
Dz 1 (N=16)	Ciclo invertido	LEC	PTZ (30mg/Kg)	X	X
Ctrl 1 (N=10)	Ciclo invertido	LEC	PTZ (30mg/Kg)	X	X
Dz 2 (N=8)	Ciclo invertido	LEC	Precondicionamiento CPL	Condicionamiento (Salina 1ml/Kg)	Evaluación CPL
Ctrl 2 (N=8)	Ciclo invertido	LEC	Precondicionamiento CPL	Condicionamiento (Salina 1ml/Kg)	Evaluación CPL
Dz 3 (N=18)	Ciclo invertido	LEC	Precondicionamiento CPL	Condicionamiento (Morfina 1mg/Kg)	Evaluación CPL
Ctrl 3 (N=11)	Ciclo invertido	LEC	Precondicionamiento CPL	Condicionamiento (Morfina 1mg/Kg)	Evaluación CPL
Ctrl 4 (N=10)	Ciclo invertido	LEC	Precondicionamiento CPL	Condicionamiento (Morfina 5mg/Kg)	Evaluación CPL

**Abreviaturas:** Exp. (experimental), Ctrl. (control), DP (día posnatal), LEC (laberinto elevado en cruz), CPL (condicionamiento de preferencia de lugar), X (sin procedimiento experimental). Esta tabla presenta en resumen, las características de cada grupo realizado durante la segunda etapa del protocolo.

#### 6.3.4 - Inducción de crisis convulsivas por Pentilenetetrazol (PTZ).

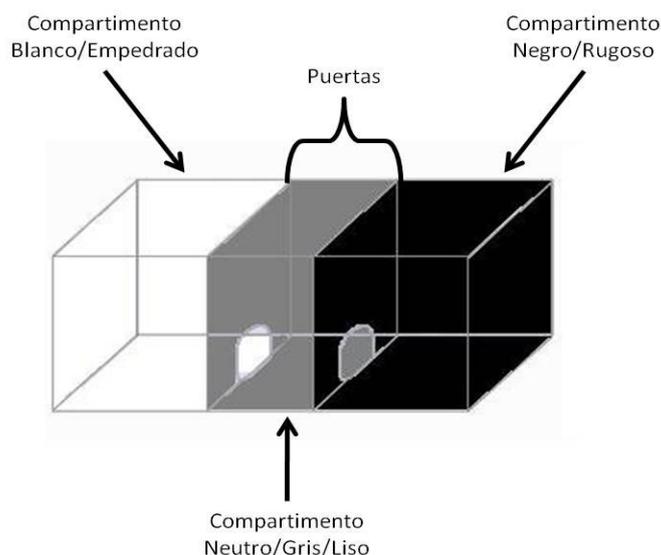
El siguiente experimento tuvo como fin determinar las diferencias en la excitabilidad cerebral entre los grupos de ratas macho control y experimental. Para esto se utilizó el PTZ, el cual es un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub> y un potenciador de la actividad glutamatérgica, extensamente utilizado en modelos animales para el estudio de ansiedad y epilepsia (Emmett-Oglesby, et al. 1990; Jung, et al. 2002).

Las ratas sometidas a esta prueba recibieron una inyección intraperitoneal de PTZ (30 mg/Kg; dosis subumbral: la probabilidad de incidencia en la génesis crisis convulsivas es menor a 50%), en seguida los animales fueron puestos en un redondel y grabados en video durante 5 minutos, terminada esta prueba las ratas fueron sacrificadas. En este protocolo se consideró como conducta epiléptica, únicamente si el animal presentaba espasmos tónico-clónicos (Emmett-Oglesby, et al. 1990; Jung, et al.

2002). Para el análisis estadístico se cuantificó el tiempo de aparición de la primera crisis convulsiva tónico-clónica (latencia en segundos) después de la administración de PTZ, mediante la prueba estadística “t-Student para muestras independientes (no pareada)”, además se compararon entre grupos, la proporción (%) de casos en los que se presentaron crisis convulsivas mediante la prueba exacta de Fisher. En ambas pruebas la significancia estadística fue de  $p \leq 0.05$ , cualquier  $p$  mayor a este valor fue considerada como no significativa.

### 6.3.5 - Prueba de Condicionamiento de Preferencia de Lugar (CPL)

En el modelo de preferencia de lugar, las propiedades reforzantes de un compuesto son asociadas con las características de un ambiente (lugar) en particular, después del condicionamiento, el animal preferirá pasar más tiempo en el ambiente asociado con la droga (Camí y Farré, 2003). Para la realización de esta prueba se diseñó una caja de condicionamiento de preferencia de lugar (fig. 17). La prueba se dividió en tres fases: la fase de preconditionamiento, la de condicionamiento y la fase de prueba, las 3 fases de la prueba se realizaron en un cuarto aislado de ruido y con luz blanca tenue. Al término del experimento las ratas fueron sacrificadas.



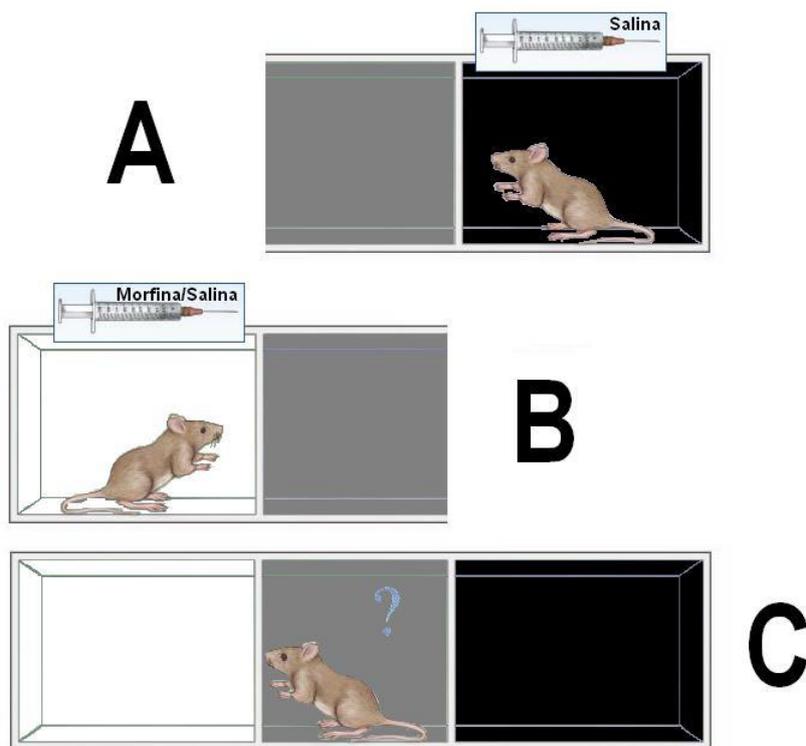
**Figura 17 - Diseño de la caja de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL).** La caja tiene las siguientes características: las dimensiones son de 60cm de largo x 40cm de ancho x 20cm de alto, compuesta de tres compartimentos, de los cuales dos son exteriores de 24cm de largo x 40cm de ancho x 20 cm de alto, los cuales cuentan con diferentes características: 1) completamente blanco con el piso empedrado, 2) el otro compartimento es completamente negro con el piso rugoso. 3) Mientras que el tercer compartimento se encuentra en el centro de la caja y se considera como un espacio neutro, sus dimensiones son de 12cm de largo x 40cm de ancho x 20cm de alto, este compartimento es completamente gris y con textura lisa en el piso. Las puertas que dividen los tres compartimentos podrán estar abiertas para permitir el libre acceso del animal o cerradas para impedir el paso del animal a través de los compartimentos.

### 1. Fase de precondicionamiento.

Esta fase consta de un periodo de habituación a la caja de CPL de cinco días, del *día 1 al 4* se colocó al animal en el compartimento neutro (central) y se le dejó explorar libremente los tres compartimentos por un periodo de 45 minutos, enseguida el animal fue regresado a su caja de alojamiento. En el *día 5* la rata se colocó nuevamente en el compartimento neutro (central) y se le dejó explorar libremente los tres compartimentos por un periodo de 15 minutos, este procedimiento fue videograbado con el fin de determinar el tiempo total que permaneció el animal en cada uno de los tres compartimentos, enseguida el animal fue regresado a su caja de alojamiento. Posteriormente, se determinó de manera estadística el compartimento preferido por el animal (Rodríguez De Fonseca, et al. 1995; Zarrindast, et al. 2006). De manera general, los animales que son expuestos al modelo condicionamiento de preferencia de lugar prefieren los compartimentos negros sobre los blancos (Mattson, 2003; Ribeiro Do Couto, et al. 2005; Lenard, et al. 2007; Aguilar, et al. 2009; Wang, et al. 2010).

### 2. Fase de condicionamiento

Esta fase consta de un periodo de tres días (*del día 6 al 8*) en los cuales se realizaron dos sesiones de condicionamiento por día. La primera sesión de condicionamiento fue realizada durante la mañana entre las 7:00 y 11:00 hrs, en la cual los animales recibieron una inyección subcutánea de solución salina (1 ml/Kg) e inmediatamente después se colocó al animal por 45 minutos en el compartimento preferido (negro) con la puerta cerrada (fig. 18-A), lo cual impidió al animal explorar cualquier otro compartimento. La segunda sesión de condicionamiento se realizó seis horas después entre las 13:00 y 17:00 hrs., durante esta sesión los animales recibieron una inyección subcutánea de solución salina (1ml/Kg) o morfina (1mg/Kg ó 5mg/Kg), inmediatamente después la rata fue colocada por 45 minutos en el compartimento menos preferido (blanco) con la puerta cerrada (fig. 18-B), lo cual impidió al animal explorar cualquier otro compartimento, esto con el fin de asociar los efectos reforzantes de una droga con un ambiente específico (Rodríguez De Fonseca, et al. 1995; Zarrindast, et al. 2006; Billa, et al. 2010).



**Figura 18 – Esquema del procedimiento realizado durante la fase de condicionamiento en la prueba de CPL.** (A y B); A representa la asociación hecha entre la inyección con solución salina 1ml/kg y el compartimento negro/rugoso de la caja de CPL y B representa la asociación hecha entre la inyección con morfina (1mg/kg o 5mg/kg) o con salina 1ml/kg con el compartimento blanco/empedrado de la caja de CPL. Finalmente C representa la fase de prueba en donde el animal decide libremente su preferencia de lugar después de un tratamiento farmacológico o placebo.

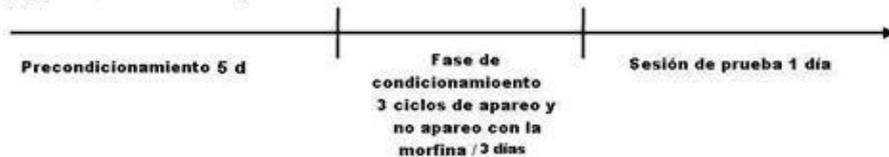
### 3. Fase de Prueba

24 horas después de la última sesión de condicionamiento (*día 9 del protocolo*) se realizó la fase de prueba de la siguiente manera: el animal fue colocado en el compartimento neutro (central) de la caja de CPL, con acceso libre a los tres compartimentos por un periodo de 15 minutos (figura 18-C), éste procedimiento fue videograbado, con la finalidad de determinar el tiempo total que el animal permaneció en cada uno de los compartimentos, y así poder determinar los cambios en la preferencia de lugar, al compararlo con los videos registrados en la fase de precondicionamiento (basales: no pareados con morfina o salina), terminada esta prueba el animal fue sacrificado (Rodríguez De Fonseca, et al. 1995; Zarrindast, et al. 2006; Billa, et al. 2010). El resumen del procedimiento realizado durante la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar se muestra en la figura 19.

El análisis estadístico se realizó de la siguiente manera: 1) se recolectaron las medias de tiempo total (900 segundos), que los animales permanecieron en cada uno de

los compartimentos (pre-tratamiento) y estas se compararon con el tiempo total que los animales permanecieron en cada uno de los compartimentos (post-tratamiento con salina ó morfina) por grupo, mediante una prueba “t-Student pareada”, esto para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativa entre el pre-tratamiento y el post-tratamiento. 2) El segundo análisis consistió en la comparación entre grupos del resultado de la resta del tiempo total (segundos) del post-tratamiento menos el pre-tratamiento mediante una ANOVA de medidas repetidas, con post-hoc (prueba de Tukey), para determinar el cambio de preferencia neto en cada uno de los compartimentos por cada grupo. En ambas pruebas la significancia estadística asignada fue de  $p \leq 0.05$ , cualquier p mayor a este valor se consideró como no significativa.

### A. Línea del Tiempo de la Prueba CPP

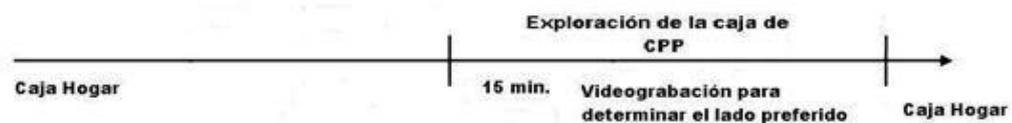


### B. Procedimiento Conductual durante las sesiones de entrenamiento y prueba

#### 1. Fase de Precondicionamiento (día 1 a 4).



#### 2. Fase de Precondicionamiento (día 5)



#### 3. Fase de Condicionamiento (día 6 a día 8).



#### 4. Fase de Prueba (día 9).

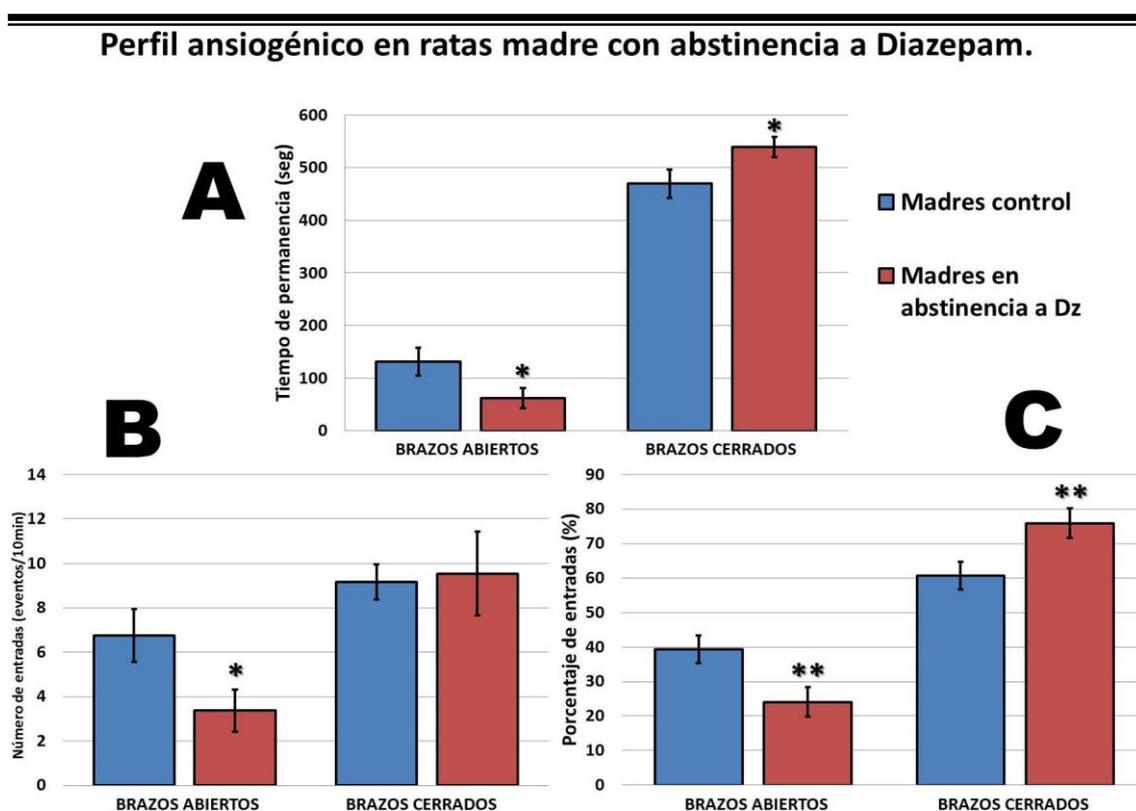


Figura 19 – Procedimiento realizado durante la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar.

## VII - RESULTADOS

### 7.1 - Medición de la ansiedad en el LEC en las ratas madre con abstinencia a Dz

El análisis del tiempo de permanencia en cada uno de los brazos del LEC, mostró que el grupo de madres con abstinencia a Dz (fig. 20; barras rojas; panel A; N=11) presentaron una diferencia significativa en el tiempo de permanencia de los animales en los brazos abiertos (BA), el cual fue de  $61 \pm 19$  seg; con respecto al tiempo del grupo control,  $131 \pm 26$  seg (barras azules; N=12;  $*p \leq 0.05$ , tabla 4). Además, el mismo grupo de animales con abstinencia a Dz se le cuantificó un mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados (BC):  $539 \pm 19$  seg; en contraste con el grupo control que tuvieron un menor tiempo de permanencia en los BC:  $469 \pm 26$  seg. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $*p \leq 0.05$ , tabla 4). Los datos de la presente tesis fueron analizados mediante la prueba estadística de ANOVA de dos vías.



**Figura 20 – Perfil ansiogénico en ratas madre con abstinencia a Dz (tratamiento crónico de 35 días interrumpido de manera abrupta).** En barras azules al grupo de madres control (N=12) y en barras rojas el grupo de madres con abstinencia a Dz (N=11). El eje de las abscisas de todos los gráficos muestra los grupos en los brazos abiertos o brazos cerrados del laberinto. En el panel A se muestra la comparación en el tiempo de permanencia: el grupo con abstinencia tiene un menor tiempo de permanencia en los BA y mayor tiempo de permanencia en los BC, estadísticamente esto fue significativo  $*p \leq 0.05$ . En el recuadro B, el grupo de ratas madres con abstinencia a Dz muestra una significativa reducción en el número de entradas a BA,  $*p \leq 0.05$ . En el panel C, se muestra que el grupo de madres con abstinencia a Dz presentó una disminución en el porcentaje de entradas a BA como un aumento significativo en las entradas a BC  $**p \leq 0.01$ .

En esta serie de experimentos fue cuantificado el número de entradas a cada uno de los brazos del LEC, se corroboró que el grupo de madres con abstinencia a Dz presentó un menor número de entradas a los BA:  $3 \pm 1$ , el cual contrasta significativamente con el grupo control:  $7 \pm 1$ , ( $*p \leq 0.05$ , tabla 4, fig. 20-B), sin embargo no hay diferencias significativas entre en el número de entradas a BC del grupo de madres con abstinencia a Dz ( $10 \pm 2$ ) con respecto al grupo de madres control ( $9 \pm 1$ ;  $p > 0.05$ , tabla 4, fig. 20-B).

El análisis del número de entradas cuantificado en proporción o porcentaje que tienen los animales en abstinencia con respecto al control, se identificó que las madres con abstinencia a Dz tuvo una mayor proporción de entradas a BC:  $78 \pm 4\%$ , el cual contrasta significativamente con el grupo de madres control que fue de:  $60 \pm 3\%$  ( $**p \leq 0.01$ , tabla 4, fig. 20-C). Asimismo, se cuantificó una menor proporción estadísticamente significativa de entradas a BA del grupo de madres con abstinencia a Dz ( $22 \pm 4\%$ ), comparado con su grupo control ( $40 \pm 3\%$ ;  $**p \leq 0.01$ , tabla 4, fig. 20-C).

En conjunto estos datos muestran que el grupo de ratas tratadas crónicamente con Dz y en estado de abstinencia presentan un perfil de ansiedad cuantificable a través de esta prueba. Tienen una preferencia de mantenerse en los BC y de entrar más a los BC.

**Tabla 4 – Resultados de la prueba LEC a ratas madre**

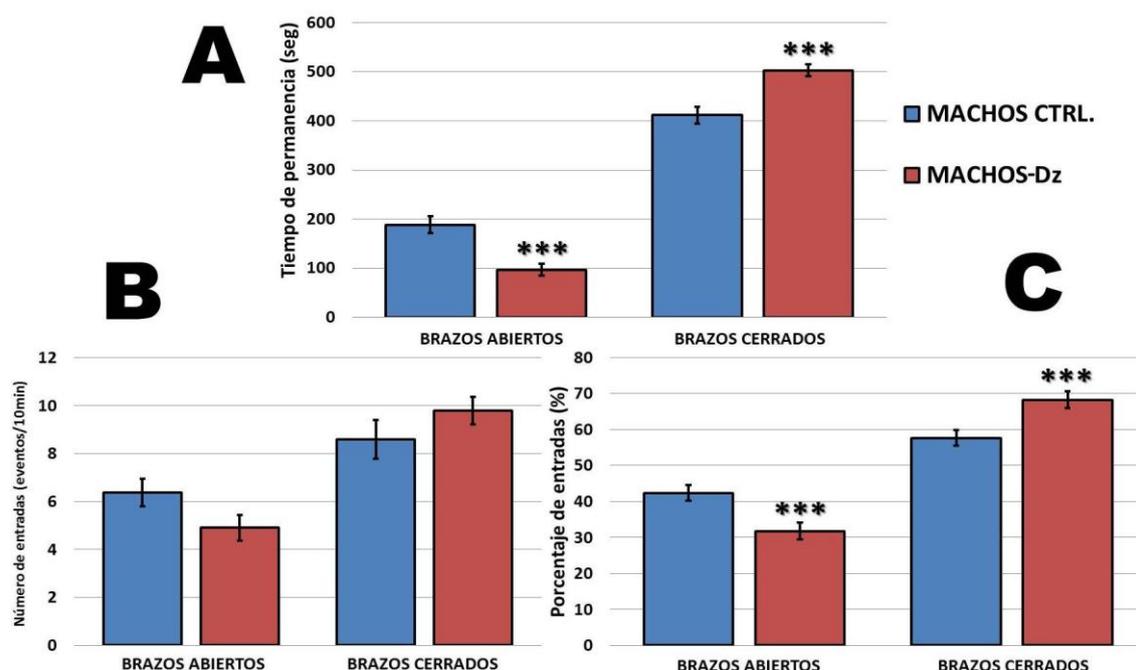
	Grupos	N	Promedio	F	p
Tiempo BA (seg.)	Madres control	12	$131 \pm 26$	4.399	$* \leq 0.05$
	Madres en abstinencia a Dz	11	$61 \pm 19$		
Tiempo BC (seg.)	Madres control	12	$469 \pm 26$	4.399	$* \leq 0.05$
	Madres en abstinencia a Dz	11	$539 \pm 19$		
Entradas BA (Número)	Madres control	12	$7 \pm 1$	4.819	$* \leq 0.05$
	Madres en abstinencia a Dz	11	$3 \pm 1$		
Entradas BC (Número)	Madres control	12	$9 \pm 1$	0.037	$> 0.05$
	Madres en abstinencia a Dz	11	$10 \pm 2$		
Porcentajes BA (%)	Madres control	12	$40 \pm 3$	10.087	$** \leq 0.01$
	Madres en abstinencia a Dz	11	$22 \pm 4$		
Porcentajes BC (%)	Madres control	12	$60 \pm 3$	10.087	$** \leq 0.01$
	Madres en abstinencia a Dz	11	$78 \pm 4$		

Se muestra los datos obtenidos de los diferentes aspectos analizados para determinar un perfil ansiogénico en la prueba del laberinto elevado en cruz (LEC). Nomenclatura: brazos abiertos (BA), brazos cerrados (BC), segundos (seg.), proporción (%), número de sujetos (N), significancia estadística (p), valores estadísticamente significativos (\*), significancia entre grupos (F).

## 7.2 – Medición de la ansiedad en el LEC de las ratas macho cuyas madres tuvieron abstinencia a Dz

El siguiente análisis de resultados de la presente tesis fue realizado en la búsqueda de cuantificar si las crías de las madres con abstinencia a Dz también muestran un estado de ansiedad como consecuencia de que en su desarrollo prenatal y postnatal temprano recibieron BZDs durante la formación de su cerebro.

### Perfil ansiogénico de ratas macho expuestas a Diazepam durante su desarrollo pre-postnatal temprano



**Figura 21 – Perfil ansiogénico en ratas macho cuyas madres tuvieron abstinencia a Dz (machos-Dz).** En barras azules se grafica al grupo control (N=37) y en barras rojas al grupo machos Dz (N=39). El eje de las abscisas de todos los gráficos muestra los grupos en los brazos abiertos o brazos cerrados del laberinto. En el panel A se muestra un menor tiempo de permanencia (seg) en los BA asociado a un significativo incremento en la permanencia en los BC de las ratas macho-Dz, comparado con el grupo control \*\*\* $p \leq 0.001$ . En el panel B, se muestra la gráfica del número de entradas a los BA y BC, no obstante que hay una tendencia semejante al tiempo de permanencia de los machos-Dz en esta comparación no hay diferencias estadísticamente significativas  $p \leq 0.3$ . En el recuadro C se grafica el porcentaje de entradas a los BA y BC, comparado con el grupo control, los machos-Dz presentaron una disminución en el porcentaje de entradas a BA asociado a un aumento significativo en el porcentaje de entradas a los BC \*\*\* $p \leq 0.001$ .

En este contexto, el grupo de las ratas macho, cuyas madres presentaron abstinencia a Dz, a partir de la presentación de estos resultados los denominaremos: machos-Dz (barras rojas, N=39) presentaron un menor tiempo de estancia en los BA:  $97 \pm 12$  seg; el cual es estadísticamente significativo al compararlo con ratas macho control:  $188 \pm 17$  seg (barras azules, N=37; \*\*\* $p \leq 0.001$ , tabla 5, fig. 21-A). Asimismo, el grupo de machos-Dz presentó un incremento significativo en el tiempo de estancia en los BC:  $503 \pm 12$  seg comparado con el grupo de machos control:  $412 \pm 17$  seg

(\*\*\* $p \leq 0.001$ , tabla 5, fig. 21-A). El análisis de estos resultados se realizó con la prueba estadística de ANOVA de dos vías.

En análisis de número de entradas a cada uno de los brazos del LEC identificó que el grupo de machos-Dz presentó un promedio de  $5 \pm 1$  entradas semejante al grupo control:  $6 \pm 1$  de entradas a los BA ( $p > 0.05$ , tabla 5, fig. 21-B). El número de entradas a los BC fue también semejante en ambos grupos: los machos-Dz mostraron un promedio de entradas de  $10 \pm 1$  con respecto al grupo control de  $9 \pm 1$  ( $p > 0.05$ , tabla 5, fig. 21-B).

No obstante a los datos anteriores, el análisis del porcentaje de entradas entre ambos grupos machos-Dz contra el grupo control, permitió identificar que los machos provenientes de un tratamiento en su desarrollo prenatal y posnatal temprano impacta en su perfil ansiogénico: el porcentaje de entradas a los BA es significativamente menor en el grupo de machos-Dz ( $32 \pm 2\%$ ) comparado con el control ( $42 \pm 2\%$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ , tabla 5, fig. 21-C). En esta secuencia de resultados, el porcentaje de entradas a los BC es significativamente mayor en los machos-Dz ( $68 \pm 2\%$ ) comparado con el promedio del grupo control con ( $58 \pm 2\%$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ , tabla 5, fig. 21-C).

De acuerdo a los datos obtenidos las ratas macho que en el desarrollo de su SNC fueron expuestas a un tratamiento con Dz, en su edad adulta muestran un importante perfil de ansiedad, el cual es muy semejante al que presentaron sus madres durante una abstinencia aguda: las ratas macho-Dz también muestran una preferencia de estancia en los BC y una disminución de entrada a los BA.

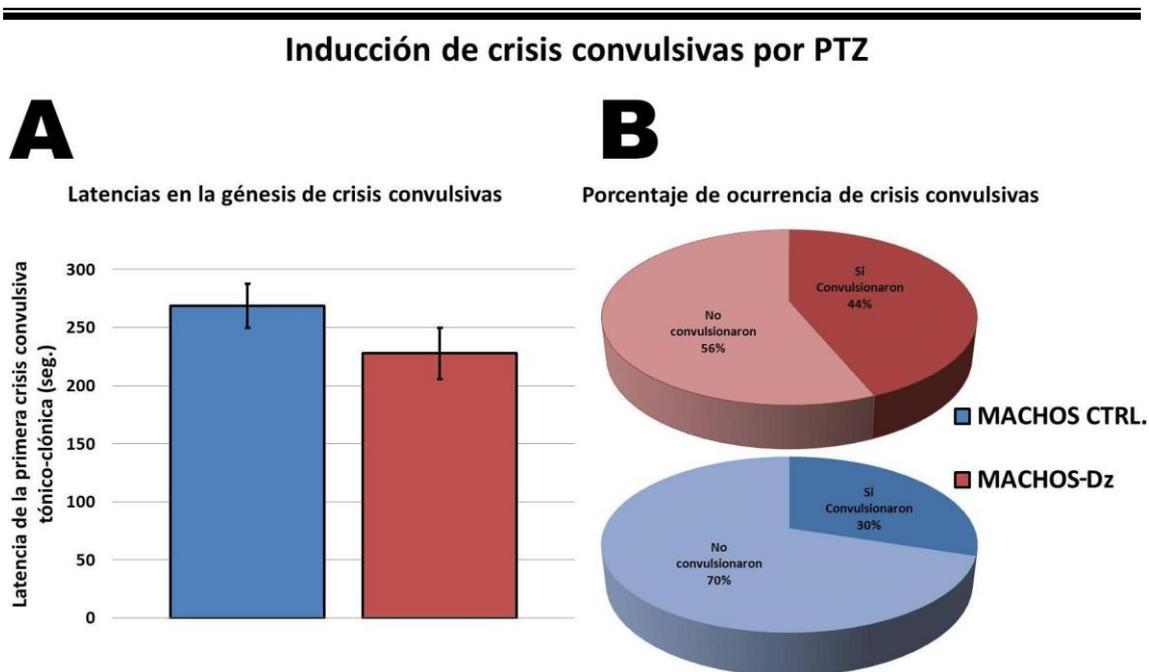
**Tabla 5 – Resultados de la prueba LEC a ratas machos**

	Grupos	N	Promedio	F	p
Tiempo BA (seg.)	Machos control	37	$188 \pm 17$	19.159	*** $\leq 0.05$
	Machos Dz	39	$97 \pm 12$		
Tiempo BC (seg.)	Machos control	37	$412 \pm 17$	19.176	*** $\leq 0.05$
	Machos Dz	39	$503 \pm 12$		
Entradas BA (Número.)	Machos control	37	$6 \pm 1$	3.590	$> 0.05$
	Machos Dz	39	$5 \pm 1$		
Entradas BC (Número.)	Machos control	37	$9 \pm 1$	1.502	$> 0.05$
	Machos Dz	39	$10 \pm 1$		
Porcentajes BA (%)	Machos control	37	$42 \pm 2$	10.774	*** $\leq 0.05$
	Machos Dz	39	$32 \pm 2$		
Porcentajes BC (%)	Machos control	37	$58 \pm 2$	10.774	*** $\leq 0.05$
	Machos Dz	39	$68 \pm 2$		

Se muestra los datos obtenidos de los diferentes aspectos analizados para determinar un perfil ansiogénico en la prueba del laberinto elevado en cruz (LEC). Nomenclatura: brazos abiertos (BA), brazos cerrados (BC), segundos (seg.), proporción (%), número de casos (N), significancia (p), significancia entre grupos (F).

### 7.3 – Estudio del umbral de las crisis convulsivas inducidas por PTZ en ratas macho expuestas a Dz en etapas de su desarrollo fetal y posnatal temprano.

En esta tesis hemos identificado que los machos-Dz muestran un estado de ansiedad evaluado en el LEC. Este se debe a la exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano. Debido a que esta condición se puede desarrollar por un cambio en la excitabilidad neuronal del SNC, la siguiente serie de experimentos fue diseñada para investigar si el cambio en la susceptibilidad de inducción farmacológica de crisis convulsivas. Por lo que sometimos a estos animales a una dosis subumbral de un agente epileptogénico como lo es el PTZ (bloqueador del receptor GABA<sub>A</sub>), se aplicó una dosis de 30mg/Kg de PTZ y se evaluaron dos variables: 1) latencia de la aparición de primer crisis tónico-clónica. 2) Porcentaje de ocurrencia de crisis convulsivas



**Figura 22 – (A) Latencia y (B) incidencia de la génesis de crisis convulsivas inducidas por PTZ en ratas macho expuestas a Dz en etapas de su desarrollo fetal y posnatal temprano.** Las barras azules representan el grupo control y las rojas las ratas macho-Dz; se muestra el promedio  $\pm$  error estándar. Las ratas provenientes de madres con abstinencia a Dz tienen una reducción en la latencia y un incremento en la incidencia de crisis tónico-clónicas por la administración de PTZ, sin embargo, no hay diferencias significativas con respecto al grupo control.

---

---

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, la latencia en la aparición de la primera crisis convulsiva después de la administración i.p. de PTZ, en el grupo de machos-Dz fue de  $227 \pm 22$  seg (barras rojas; fig. 22, N=16) comparada con el grupo control:  $269 \pm 19$  seg (barras azules, N=10). Esta diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ , figura 22-A, tabla 7).

Los resultados muestran la incidencia de casos de crisis convulsivas tónico-clónicas (analizadas mediante una prueba exacta de Fisher). El grupo de machos-Dz presentó un total de 7 casos/16 expuestos representa un 44% de la población con respecto al grupo control en el que se presentaron 3 casos/ 10 expuestos, lo que representa un 30% de la población. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ , figura 22-B, tabla 7).

En resumen con los datos obtenidos, se puede identificar que no obstante a que el grupo de machos-Dz muestra un perfil de ansiedad, este evento no se encuentra asociado a un cambio en la susceptibilidad de desarrollar crisis convulsivas con respecto al grupo control. Es decir, los machos-Dz no modifican su umbral de inducción de crisis convulsivas.

**Tabla 7 – Latencia e incidencia de crisis convulsivas inducidas por PTZ.**

Grupos	N	Latencia (seg.)	T (p)	Incidencia (%)		Fisher (p)
				Convulsiones	Sin convulsiones	
Machos Ctrl. (PTZ 30 mg/kg)	10	269 ± 19	>0.05	30%	70%	>0.05
Machos-Dz (PTZ 30 mg/kg)	16	228 ± 22		44%	56%	

**Tabla 7** - En la primera columna se encuentran los grupos diseñados para esta prueba, en la segunda columna el número de animales por grupo (N). En la tercera columna el promedio de la latencia en la aparición de la primera crisis tónica-clónica medida en segundos. El valor de T es expuesto en la cuarta columna en la que se muestra la significancia. En la quinta y sexta columna se muestra la incidencia de casos de animales que convulsionaron y que no convulsionaron respectivamente. En la última columna, la significancia obtenida de la comparación en la incidencia de casos con crisis convulsivas entre grupos con la prueba exacta de Fisher.

#### **7.4 – Efecto de la exposición a Dz en etapas del desarrollo fetal y posnatal temprano en la susceptibilidad para adquirir adicción a morfina en ratas macho.**

Se analizó una correlación entre la exposición de Dz en etapas tempranas del desarrollo y la susceptibilidad para adquirir adicción a morfina mediante la prueba de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL). Para identificar si los machos-Dz tienen una mayor susceptibilidad para ser adictos a morfina, realizamos el siguiente experimento: los animales fueron entrenados en una caja con ambientes diferentes, en condiciones normales los sujetos prefieren un ambiente oscuro, con una textura rugosa; en contraste, el lugar menos preferido (blanco con textura empedrada) se asocia con la administración de morfina; de esta manera los animales con tendencia a la adicción invertirán su preferencia a permanecer en un lugar que antes no era el preferido pero en el que se les administra una droga reforzante.

Los resultados indican que el grupo de animales control (N=8) prefiere estar en un lugar oscuro (tiempo permanencia:  $574 \pm 53$  seg; fig 24-A; barras azules) con respecto a quedarse en un compartimento blanco (tiempo de permanencia:  $184 \pm 37$  seg) o un compartimento neutro (tiempo de permanencia:  $142 \pm 28$  seg) esta condición es denominada pre-tratamiento la cual aduce que al animal no se le ha administrado ningún tratamiento o droga. Eventualmente 24, 48 y 72 horas después, este mismo grupo de animales recibieron solución salina s.c.: una aplicación dentro del compartimento blanco y otra aplicación en el compartimento oscuro (N=8; barras rojas; fig 23-A), en esta nueva condición, los animales presentaron una reducción significativa en la permanencia en el compartimento negro (tiempo de permanencia:  $447 \pm 52$  seg;  $**p \leq 0.01$ ), sin cambios significativos en la permanencia en el compartimento menos preferido (blanco; tiempo de permanencia:  $218 \pm 27$  seg,  $p > 0.05$ ) y un incremento significativo en el compartimento neutro (tiempo de permanencia:  $235 \pm 36$  seg.,  $**p \leq 0.01$ ). Esto indica que los animales control con tratamiento con solución salina manifiestan una aversión dirigida hacia la permanencia en los compartimentos negro y blanco y dirige su nueva preferencia hacia un compartimento sin estímulo asociado (neutro), esta aversión se debe a dos factores: 1) la solución salina no genera reforzamiento y 2) resulta aversivo la aplicación dolorosa parenteral de la solución salina (tabla 8).

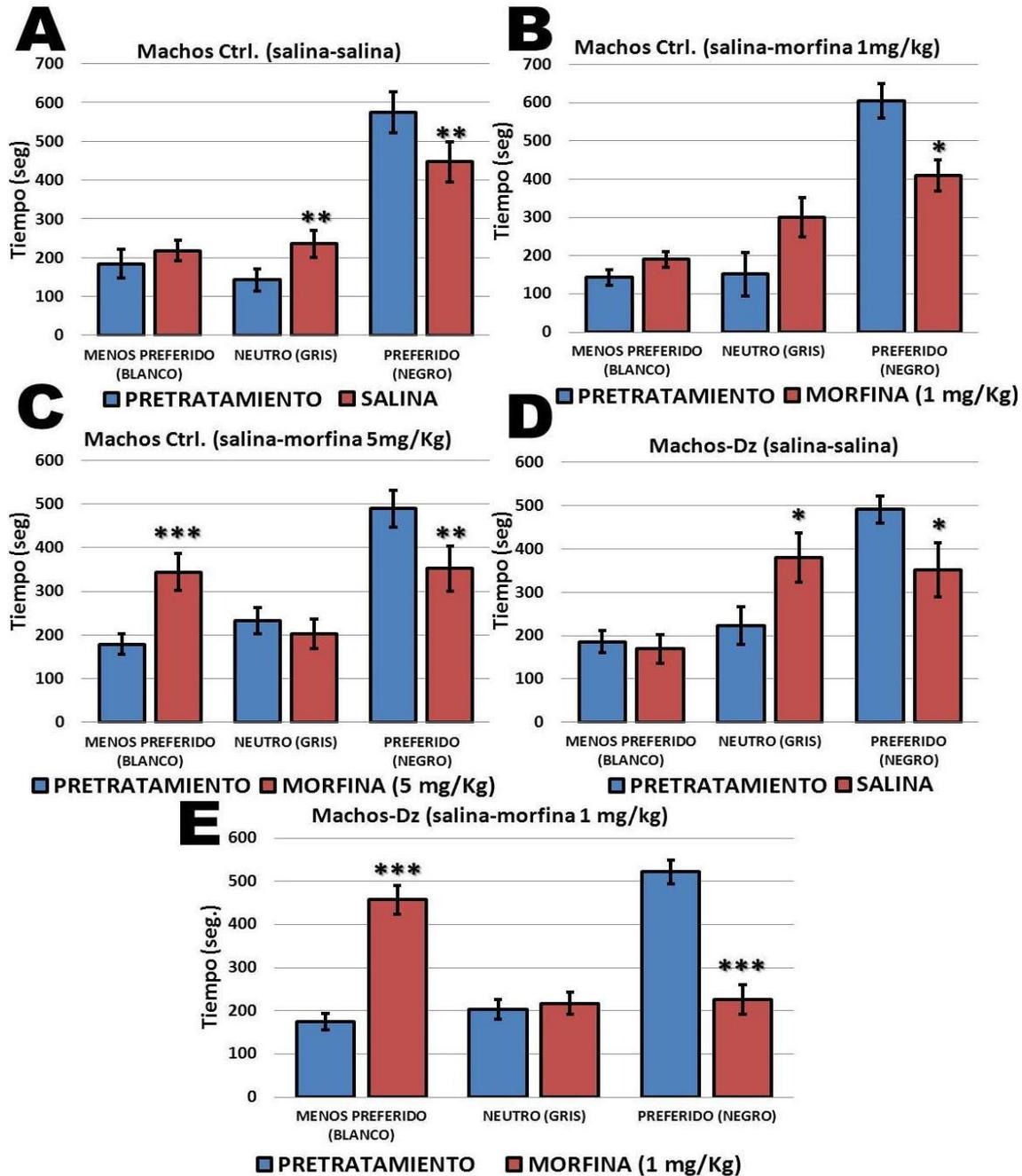
Un segundo grupo control pero administrando una dosis baja de morfina (1mg/Kg; N=11) fue realizado para identificar el factor condicionante que tiene el opioide a una dosis pequeña (fig 23-B). El perfil de preferencia del compartimento antes

de la administración de la morfina (condición pre-tratamiento; barras azules) es el siguiente: este grupo de sujetos prefieren el compartimento negro (tiempo de permanencia:  $605 \pm 47$  seg) que el neutro (tiempo de permanencia:  $152 \pm 23$  seg) y el blanco (tiempo de permanencia:  $143 \pm 27$  seg). Sin embargo, la administración s.c. de morfina ( $1 \text{ mg/Kg}$  una dosis cada 24 hrs durante tres días; barras rojas) en el compartimento blanco asociada a la aplicación de solución salina s.c. en el compartimento negro (una dosis cada 24 hrs durante tres días) permitió identificar que hubo una reducción significativa en el tiempo de permanencia en el sitio preferido (compartimento negro; tiempo de permanencia:  $410 \pm 44$  seg;  $*p \leq 0.05$ ), sin cambios significativos en la estancia en el compartimento neutro (tiempo de permanencia:  $301 \pm 57$  seg;  $p > 0.05$ ) y el sitio menos preferido (compartimento blanco; tiempo de permanencia:  $190 \pm 21$  seg;  $p > 0.05$ ). Esto indica que la aplicación morfina a una dosis baja no es un reforzador suficiente para que el animal prefiera el sitio blanco (tabla 8).

Un tercer grupo control le fue administrada morfina a altas concentraciones ( $5 \text{ mg/Kg}$ ;  $N=10$ ; fig 23-C), previa a la aplicación del opioide los animales mostraron el clásico perfil de preferencia (barras azules): los animales prefieren estar en el compartimento negro (tiempo de permanencia:  $550 \pm 56$  seg) con respecto al neutro (tiempo de permanencia:  $208 \pm 39$  seg) y al blanco (tiempo de permanencia:  $142 \pm 25$  seg). La administración de morfina s.c. ( $5 \text{ mg/Kg}$  cada 24 hrs durante tres días en el compartimento blanco; barras rojas) asociado a la aplicación de solución salina s.c. (una dosis cada 24 hrs durante tres días en el compartimento negro), el perfil de preferencia es modificado significativamente: el tiempo de permanencia en el compartimento preferido disminuyó ( $390 \pm 35$  seg;  $**p \leq 0.01$ ) y el tiempo de permanencia en el compartimento blanco se incremento:  $323 \pm 34$  seg ( $***p \leq 0.001$ ). El tiempo de permanencia en el compartimento neutro no se modificó ( $186 \pm 18$  seg;  $p > 0.05$ ). Estos datos indican que la administración de una dosis alta de morfina induce un cambio conductual en el animal, el cual consiste en un efecto reforzador que es capaz de reducir la aversión y asociar el efecto farmacológico de la morfina con el sitio menos preferido (tabla 8).

Los datos obtenidos en esta tesis muestran que animales sin ningún tratamiento previo con Dz solamente modifican su preferencia por el espacio blanco o menos preferido solamente si se aplica morfina a altas dosis. Para conocer cuál es el efecto de los tratamientos de morfina en animales cuyo desarrollo embriológico y lactancia fueron expuestos a Dz (machos-Dz), se realizaron los siguientes grupos.

Comparación en el cambio de preferencia de lugar pre y postratamiento



**Figura 23 – Cambio en la preferencia de los animales hacia los compartimentos de la caja de CPL antes y después del tratamiento con solución salina o morfina.** Se grafica promedios  $\pm$  error estándar. A-C son grupos de animales control en tanto que D y E son grupos expuestos prenatal y posnatalmente a Dz (machos-Dz). Los resultados muestran que el perfil de preferencia inicial en todos los grupos (antes de la aplicación de cualquier droga; barras azules) es el de un mayor tiempo de estancia en el sitio negro. En todos los casos en el sitio oscuro se aplicó solución salina, en contraste en los grupos que se indica aplicación de morfina ésta fue administrada en el compartimento blanco de la CPL. (A) La aplicación de solución salina reduce la permanencia en el compartimento negro y aumenta el tiempo de permanencia en el compartimento que no está asociado a ninguna sustancia (neutro). (B) La aplicación de morfina a dosis bajas reduce el tiempo de permanencia en el compartimento negro. (C) La aplicación de dosis altas de morfina cambia el perfil de preferencia, incrementa la estancia en el sitio blanco y la reduce en el sitio negro. (D) El perfil de los machos-Dz tratados con solución salina tiene un perfil semejante a su grupo control. (E) Nótese que el tratamiento con dosis bajas de morfina en los machos-Dz tiene un importante efecto en el incremento de la preferencia por un sitio adverso y reducción por un sitio preferido. Prueba de t-pareada \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $\leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Los resultados del grupo de machos-Dz indican que tienen un perfil de preferencia de permanencia por los lugares oscuros semejante que el grupo control (barras azules; N=8; fig 23-D), antes del tratamiento con salina o morfina, los animales invierten más tiempo en el cuarto negro (tiempo de permanencia:  $492\pm 31$  seg), en el cuarto neutro (tiempo de permanencia:  $223\pm 43$  seg) y menos en el compartimento blanco (tiempo de permanencia:  $186\pm 26$  seg). La administración pareada de solución salina s.c. en el compartimento negro alternada por una dosis en el compartimento blanco (dosis cada 24 hrs durante tres días; barras rojas; N=8; fig 23-D), Disminuyó significativamente la preferencia por el sitio preferido previamente, el tiempo de permanencia disminuyó (compartimento negro:  $352\pm 63$  seg;  $*p\leq 0.05$ ), asociado con un incremento significativo en la estancia del compartimento neutro (tiempo de permanencia:  $379\pm 57$  seg;  $**p\leq 0.01$ ). La estancia en el sitio menos preferido no se modificó (tiempo de permanencia:  $169\pm 33$  seg;  $p>0.05$ ). En conjunto estos datos indican que la exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano en ratas macho, no cambia la conducta del animal dentro de la caja de CPL y la respuesta de los machos-Dz ante la aplicación de solución salina no tiene efectos reforzantes, es decir, que estos animales son semejantes en sus conductas al grupo control bajo las mismas condiciones.

Ante la pregunta de si el Dz administrado durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano, induce una predisposición a generar adicción a la morfina en las ratas macho adultos, se realizó el siguiente grupo experimental

En el grupo de machos-Dz antes de recibir cualquier tratamiento farmacológico se identificó un perfil de preferencia por el compartimento negro (tiempo de permanencia:  $522\pm 28$  seg; N=18; fig 23-E; barras azules), con respecto al compartimento neutro (tiempo de permanencia:  $203\pm 23$  seg) y el compartimento blanco (tiempo de permanencia:  $175\pm 19$  seg). El tratamiento farmacológico con morfina s.c. a estos animales (dosis 1mg/Kg; cada 24 hrs durante tres días en el compartimento blanco pareado con aplicación de solución salina s.c. en el compartimento negro; fig 23-E; barras rojas), permitió identificar un incremento significativo de preferencia por el sitio que previamente era aversivo (compartimento blanco; tiempo de permanencia:  $457\pm 34$  seg;  $***p\leq 0.001$ ). Asociado a este hallazgo también se cuantificó en este grupo una reducción en el tiempo de estancia del compartimento preferido (negro; tiempo de permanencia:  $226\pm 34$  seg;  $***p\leq 0.001$ ), sin cambios significativos en el compartimento neutro (tiempo de permanencia:  $217\pm 26$  seg.,  $p>0.05$ ). Esto indica que la exposición a

Dz durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano puede estar correlacionada con la disminución de la dosis umbral de morfina necesaria para generar un efecto reforzante en el animal, es decir, una facilitación de la adicción a la morfina.

**Tabla 8 – Preferencia de lugar pre y pos-tratamiento con solución salina/morfina.**

A) Grupo Ctrl. salina-salina	N	Tiempo (seg.)	<i>p</i>
Compartimento menos preferido-blanco (pretratamiento)	8	184 ± 37	>0.05
Compartimento menos preferido-blanco (salina)	8	218 ± 27	
Compartimento neutro-gris (pretratamiento)	8	142 ± 28	**≤0.01
Compartimento neutro-gris (salina)	8	235 ± 36	
Compartimento preferido-negro (pretratamiento)	8	574 ± 53	**≤0.01
Compartimento preferido-negro (salina)	8	447 ± 52	
B) Grupo Ctrl. salina-morfina 1mg/kg	N	Tiempo (seg.)	<i>p</i>
Compartimento menos preferido-blanco (pretratamiento)	11	143 ± 27	>0.05
Compartimento menos preferido-blanco (morfina 1mg/kg)	11	190 ± 21	
Compartimento neutro-gris (pretratamiento)	11	152 ± 23	>0.05
Compartimento neutro-gris (morfina 1mg/kg)	11	301 ± 57	
Compartimento preferido-negro (pretratamiento)	11	605 ± 47	*≤0.05
Compartimento preferido-negro (morfina 1mg/kg)	11	410 ± 44	
C) Grupo Ctrl. salina-morfina 5mg/kg	N	Tiempo (seg.)	<i>p</i>
Compartimento menos preferido-blanco (pretratamiento)	10	142 ± 25	***≤0.001
Compartimento menos preferido-blanco (morfina 5mg/kg)	10	323 ± 34	
Compartimento neutro-gris (pretratamiento)	10	208 ± 39	>0.05
Compartimento neutro-gris (morfina 5mg/kg)	10	186 ± 18	
Compartimento preferido-negro (pretratamiento)	10	550 ± 56	**≤0.01
Compartimento preferido-negro (morfina 5mg/kg)	10	390 ± 35	
D) Machos-Dz salina-salina	N	Tiempo (seg.)	<i>P</i>
Compartimento menos preferido-blanco (pretratamiento)	8	186 ± 26	>0.05
Compartimento menos preferido-blanco (salina)	8	169 ± 33	
Compartimento neutro-gris (pretratamiento)	8	223 ± 43	*≤0.05
Compartimento neutro-gris (salina)	8	379 ± 57	
Compartimento preferido-negro (pretratamiento)	8	492 ± 31	*≤0.05
Compartimento preferido-negro (salina)	8	352 ± 63	
E) Machos Dz salina-morfina 1mg/kg	N	Tiempo (seg.)	<i>P</i>
Compartimento menos preferido-blanco (pretratamiento)	18	175 ± 19	***≤0.001
Compartimento menos preferido-blanco (morfina 1mg/kg)	18	457 ± 34	
Compartimento neutro-gris (pretratamiento)	18	203 ± 23	>0.05
Compartimento neutro-gris (morfina 1mg/kg)	18	217 ± 26	
Compartimento preferido-negro (pretratamiento)	18	522 ± 28	***≤0.001
Compartimento preferido-negro (morfina 1mg/kg)	18	226 ± 34	

La **tabla 8**. Se muestra por grupo (machos Ctrl. y Machos-Dz), el tiempo promedio de permanencia en cada uno de los compartimentos (preferido, neutro, menos preferido) y la comparación pre-tratamiento (registro basal) y pos-tratamiento (administración de solución salina o morfina 1mg/Kg, 5mg/Kg) y su significancia estadística (*p*).

## 7.5 - Análisis cuantitativo de los tiempos de preferencia en el CPL

Descrito previamente en el método de esta tesis nosotros realizamos un análisis cuantitativo del tiempo invertido por los animales en cada compartimento de la caja de CPL y cuantificamos el cambio de su preferencia inducido por la morfina. Obteniendo la diferencia de tiempo real ( $\Delta t$ , en segundos), el cual fue calculado a través de la diferencia del tiempo de permanencia del día en el que se aplicó la droga con respecto al día de pre-condicionamiento (pre-tratamiento; Zarrindast, et al. 2006). El análisis se realizó con un ANOVA de medidas repetidas con post-hoc (prueba de Tuckey). Por lo que  $\Delta t$  positiva representa un incremento en la permanencia del compartimento, en contraste el valor negativo de  $\Delta t$  expresa una disminución en la permanencia del compartimento. Si un grupo de animales tenía un valor el cual después de la inyección de una droga se hizo positivo significa un cambio cuantitativo en la preferencia por ese sitio.

El análisis de los grupos control y machos-Dz (ambos grupos con N=8) muestra claramente que ambos tienen el mismo perfil de preferencia: una reducción por el sitio oscuro y un incremento en el espacio neutro sin cambios en la permanencia por el sitio blanco. En este contexto, la aplicación de morfina a dosis baja (1mg/Kg; N=11; barras amarillas) comparándola con el grupo control (barras cafés) los  $\Delta t$  de permanencia en el compartimento negro, neutro y blanco son semejantes y sin diferencia significativas (fig. 24-A). Esto se reduce a afirmar que la solución salina no tiene efectos reforzantes y que la dosis de 1mg/Kg de morfina es muy débil para inducir un cambio de preferencia (tabla 9).

La aplicación de morfina a una dosis de 5mg/Kg (N=10; barras moradas) a animales control en el espacio blanco o menos preferido permite un cambio en la elección de permanencia por este compartimento, la  $\Delta t$  fue de  $181 \pm 23$  seg; el cual es significativamente mayor al grupo control que recibió solución salina (N=8; barras cafés)  $34 \pm 28$  seg (\*\* $p \leq 0.01$ , tabla 9), sin encontrar diferencias entre estos grupos en la permanencia del compartimento neutro y por el compartimento preferido (negro; fig. 24-B). Este resultado indica que cuantitativamente la morfina induce un cambio de preferencia en animales control siempre y cuando su dosis sea alta.

Comparación del cambio de preferencia de lugar entre grupos.

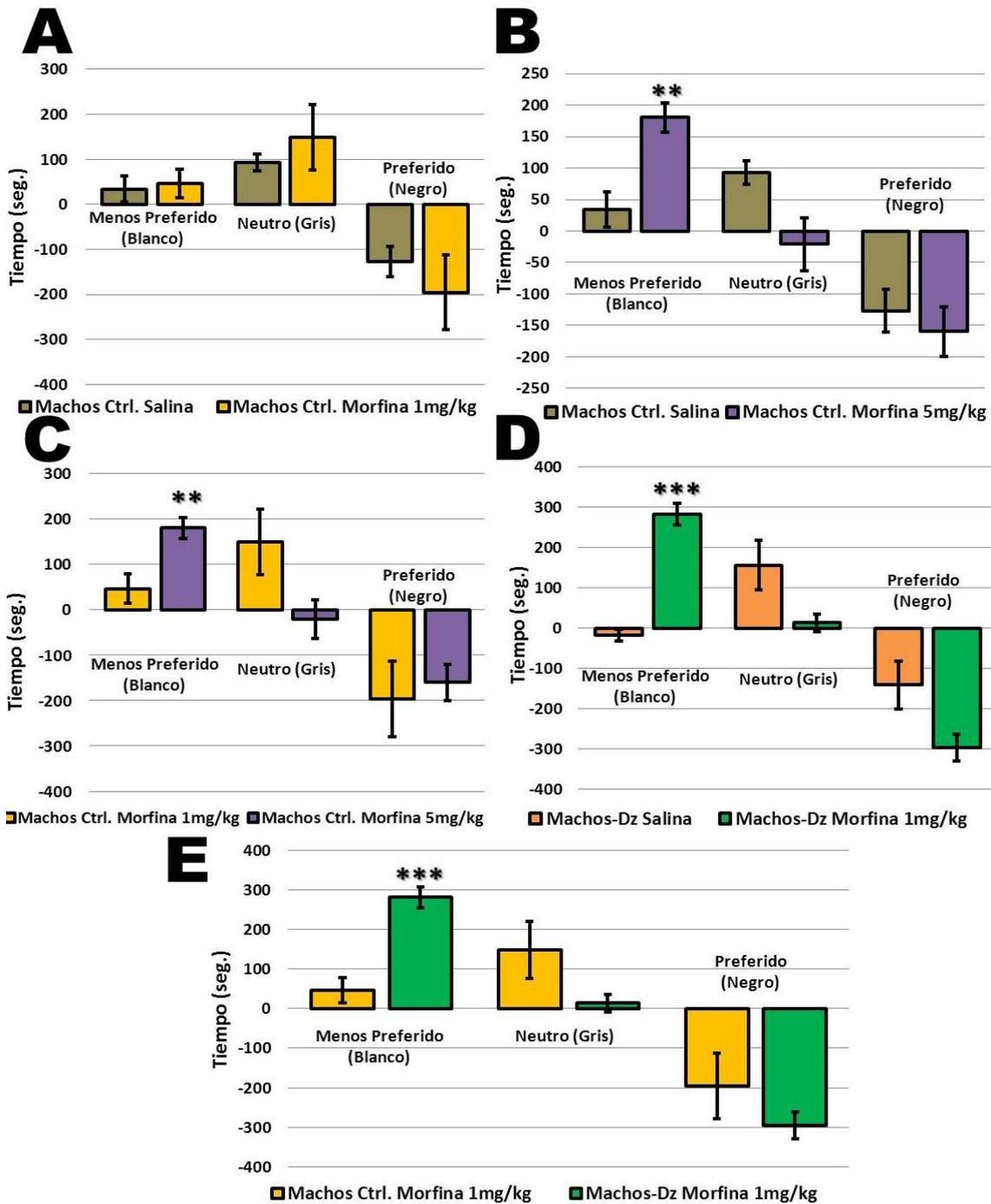


Figura 24 – Comparación en el cambio de preferencia de lugar entre grupos. Se grafica promedios  $\pm$  error estándar. Los resultados en (A) muestran la comparación hecha entre los  $\Delta t$  de los grupos control salina y morfina (1mg/Kg) en los que no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en los compartimentos blanco, neutro y negro. En (B) se grafica una mayor preferencia significativa por el compartimento blanco (menos preferido) del grupo control al cual se le administró una dosis alta de morfina (5mg/Kg) con respecto al grupo control salina. La comparación hecha en (C) muestra una mayor preferencia por el compartimento blanco en el grupo control con dosis altas de morfina (5mg/Kg) frente al grupo control con dosis bajas de morfina (1mg/Kg). (D) Los machos-Dz a los que se les administró una dosis baja de morfina (1mg/Kg) cuantificaron una mayor preferencia ( $\Delta t$ ) por el sitio blanco al ser comparados contra los machos-Dz a los cuales se les administró solución salina. Finalmente en (E) se muestra que la administración de dosis bajas de morfina inducen una mayor preferencia significativa por el sitio blanco en el grupo de machos-Dz con respecto al grupo control. Por otro lado no se encontraron cambios significativos en los demás compartimentos (neutro y negro) en las comparaciones B, C, D y E. Prueba ANOVA de medidas repetidas; \*\* $\leq 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Al realizar la comparación de  $\Delta t$  entre los grupos de animales control a los cuales se les aplicó dosis de morfina bajas (1mg/Kg; N=11; fig. 24-C; barras amarillas) o altas (5mg/kg; N=10; barras moradas) se constató que el cambio de preferencia por el compartimento blanco va relacionado con el incremento en la dosis del opiáceo: los animales con altas dosis de morfina prefieren estar en un sitio aversivo (permanencia  $181 \pm 23$  seg) en contraste con los animales con dosis bajas con una reducción significativa en este tiempo ( $46 \pm 32$  seg; tabla 9;  $**p \leq 0.01$ ). El tiempo de permanencia en ambos compartimentos neutro y negro no tuvieron diferencias significativas por el incremento de la dosis de morfina.

El grupo de ratas macho tratadas con Dz durante su desarrollo prenatal y posnatal temprano tiene una preferencia por estar en el compartimento negro de la CPL. Nuestros resultados indican que este grupo de animales pueden cambiar su preferencia de estancia en el compartimento blanco en el que han recibido un tratamiento con morfina a dosis bajas, aspecto farmacológico que en los animales control no se manifiesta de esta forma. El análisis del cambio de preferencia de este grupo se encuentra graficado en la figura 24-D. Los animales que recibieron 1mg/Kg de morfina s.c. tienen un incremento significativo de preferencia en el compartimento blanco ( $\Delta t = 282 \pm 27$  seg; N=18; barras verdes), en contraste con el grupo de machos-Dz que recibieron solución salina s.c. ( $\Delta t = -17 \pm 15$  seg; N=8; barras anaranjadas;  $***p \leq 0.001$ ; tabla 9). De la misma forma como en grupos anteriores, la preferencia en los compartimentos gris y negro no se modifica por la aplicación de morfina a dosis bajas.

Finalmente, el análisis de la aplicación de una dosis baja de morfina entre el grupo control y el grupo de machos-Dz nos permiten identificar un hallazgo de interesantes implicaciones farmacológicas. La misma dosis en animales control no modifica la preferencia del compartimento blanco sin embargo, un animal expuesto a Dz en etapas tempranas de su desarrollo, esta dosis de morfina es lo suficientemente fuerte para modificar la preferencia por el compartimento blanco. Estos datos son el sustento de nuestra discusión en la que aducimos la facilidad de adicción que tienen estos animales al opiáceo. En este contexto los animales control tratados con morfina (1mg/Kg; N=11; barras amarillas) tienen una  $\Delta t$  de  $46 \pm 32$  seg, mientras que el grupo de machos-Dz tratados con morfina (1mg/Kg; N=18; barras verdes) tienen una  $\Delta t$  de  $282 \pm 27$  seg ( $***p \leq 0.001$ ; figura 24-E; tabla 9). No se obtuvieron diferencias

significativas al comparar la preferencia en los tiempos de permanencia en los compartimentos neutro y negro en ambos grupos.

**Tabla 9 – Comparación entre grupos de la diferencia tiempo ( $\Delta t$ ) en cada compartimento.**

Lugar	Grupo (I)	N (I)	$\Delta t$ I (seg)	Grupo (II)	N (II)	$\Delta t$ II (seg)	Tukey (p)	DMS (p)
Menos preferido (blanco)	Control salina	8	34 ± 28	Control morfina 5mg/Kg	10	181 ± 23	**≤0.01	**≤0.01
				Machos-Dz salina	8	-17 ± 15	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	282 ± 27	***≤0.001	***≤0.001
	Control morfina 1mg/Kg	11	46 ± 32	Control morfina 5mg/Kg	10	181 ± 23	**≤0.01	**≤0.01
				Machos-Dz salina	8	-17 ± 15	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	282 ± 27	***≤0.001	***≤0.001
	Control morfina 5mg/Kg	10	181 ± 23	Control salina	8	34 ± 28	**≤0.01	**≤0.01
				Control morfina 1mg/Kg	11	46 ± 32	**≤0.01	**≤0.01
				Machos-Dz salina	8	-17 ± 15	***≤0.001	***≤0.001
				Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	282 ± 27	>0.05	**≤0.01
	Machos-Dz salina	8	-17 ± 15	Control morfina 1mg/Kg	11	46 ± 32	>0.05	>0.05
				Control 4 morfina 5mg/Kg	10	181 ± 23	***≤0.001	***≤0.001
				Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	282 ± 27	***≤0.001	***≤0.001
	Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	282 ± 27	Control salina	8	34 ± 28	***≤0.001	***≤0.001
				Control morfina 1mg/Kg	11	46 ± 32	***≤0.001	***≤0.001
Control 4 morfina 5mg/Kg				10	181 ± 23	>0.05	**≤0.01	
Machos-Dz salina				8	-17 ± 15	***≤0.001	***≤0.001	
Neutro (gris)	Control salina	8	93 ± 19	Control morfina 1mg/Kg	11	149 ± 72	>0.05	>0.05
				Control morfina 5mg/Kg	10	-21 ± 42	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	14 ± 22	>0.05	>0.05
	Control morfina 1mg/Kg	11	149 ± 72	Control morfina 5mg/Kg	10	-21 ± 42	>0.05	**≤0.01
				Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	14 ± 22	>0.05	>0.05
	Control morfina 5mg/Kg	10	-21 ± 42	Control salina	8	93 ± 19	>0.05	>0.05
				Control morf 1mg/Kg	11	149 ± 72	>0.05	**≤0.01
				Machos-Dz salina	8	157 ± 61	>0.05	**≤0.01
				Machos-Dz morf 1mg/Kg	18	14 ± 22	>0.05	>0.05
	Machos-Dz salina	8	157 ± 61	Control morf 1mg/Kg	11	149 ± 72	>0.05	>0.05
				Control morf 5mg/Kg	10	-21 ± 42	>0.05	**≤0.01
				Machos-Dz morf 1mg/Kg	18	14 ± 22	>0.05	*≤0.05
	Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	14 ± 22	Control salina	8	93 ± 19	>0.05	>0.05
				Control morf 1mg/Kg	11	149 ± 72	>0.05	*≤0.05
				Control morf 5mg/Kg	10	-21 ± 42	>0.05	>0.05
Machos-Dz salina				8	157 ± 61	>0.05	*≤0.05	

Preferido (negro)	Control salina	8	-127 ± 34	Control morf 1mg/Kg	11	-196 ± 83	>0.05	>0.05
				Control morf 5mg/Kg	10	-160 ± 40	>0.05	>0.05
				Machos-Dz salina	8	-140 ± 59	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morf 1mg/Kg	18	-296 ± 34	>0.05	*≤0.05
	Control morfina 1mg/Kg	11	-196 ± 83	Control salina	8	-127 ± 34	>0.05	>0.05
				Control morf 5mg/Kg	10	-160 ± 40	>0.05	>0.05
				Machos-Dz salina	8	-140 ± 59	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morf 1mg/Kg	18	-296 ± 34	>0.05	>0.05
	Control morfina 5mg/Kg	10	-160 ± 40	Control salina	8	-127 ± 33	>0.05	>0.05
				Control morf 1mg/Kg	11	-196 ± 83	>0.05	>0.05
				Machos-Dz salina	8	-140 ± 59	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morf 1mg/Kg	18	-296 ± 34	>0.05	*≤0.05
	Machos-Dz salina	8	-140 ± 59	Control morf 1mg/Kg	11	-196 ± 83	>0.05	>0.05
				Control morf 5mg/Kg	10	-160 ± 40	>0.05	>0.05
				Machos-Dz morf 1mg/Kg	18	-296 ± 34	>0.05	*≤0.05
	Machos-Dz morfina 1mg/Kg	18	-296 ± 34	Control salina	8	-127 ± 34	>0.05	*≤0.05
				Control morf 1mg/Kg	11	-196 ± 83	>0.05	>0.05
				Control morf 5mg/Kg	10	-160 ± 40	>0.05	*≤0.05
				Machos-Dz salina	8	-140 ± 59	>0.05	*≤0.05

**Tabla 9** - Se muestra la  $\Delta t$  obtenida de la resta del pos-tratamiento menos el pre-tratamiento por cada uno de los grupos (grupo I), se compara, las  $\Delta t$  del pos-tratamiento menos  $\Delta t$  del pre-tratamiento entre grupos (grupo II) en cada uno de los compartimentos de la caja de CPL, mediante una ANOVA de medidas repetidas. Nota: los promedios positivos representan un aumento en el tiempo de estancia en el compartimento, en tanto que los negativos representa una disminución en el tiempo de estancia. En la penúltima columna se presentan las significancias arrojadas por la ANOVA con post-hoc Tuckey y en la última columna los valores con DMS.

## VIII – DISCUSIÓN

La presente tesis es un estudio secuencial de dos enfoques complementarios; el primero conductual (ansiedad y adicción) y el segundo farmacológico. La hipótesis general de este trabajo fue demostrar que la exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano en la rata macho genera en la edad adulta de dichos animales una susceptibilidad a desarrollar adicción con una dosis baja de morfina, a generar un estado basal de ansiedad y a modificar la susceptibilidad para generar crisis convulsivas. Lo cual sugiere que la administración de BZDs durante el desarrollo no solo tiene implicaciones en la correcta formación del sistema GABAérgico sino también en otros neurotransmisores como las aminas biogénicas.

Esto se demostró realizando un experimento en dos fases. En la primera etapa, a ratas hembra a partir de la segunda semana de gestación se les administró Dz (10mg/Kg), este tratamiento fue crónico y duró 35 días (madres en abstinencia a Dz, ver capítulo 6.3.1). Cabe resaltar que para el objetivo de este protocolo la administración de Dz fue vía oral principalmente por dos razones, la primera es que al usar ratas gestantes se vuelve poco funcional la administración del fármaco por vía i.p. y la segunda es evitar algún tipo de estrés en la rata gestante, ya que diversos autores coinciden en que eventos ambientales estresantes durante periodos críticos del desarrollo producen cambios en el desarrollo neuroendocrino perdurables, los cuales pueden influenciar las respuestas ante drogas reforzantes y predisponen a las crías a desarrollar adicción, además, el estrés prenatal tiene efectos a largo plazo en la actividad del sistema dopaminérgico así como en las conductas relacionadas a este neurotransmisor (Fride y Weinstock, 1989; Henry et al., 1994). Al término de dicho tratamiento se identificó en las madres con síndrome de abstinencia a Dz, una mayor proporción de entradas así como un mayor tiempo de permanencia en los BC del LEC, lo cual se correlaciona directamente con un estado de ansiedad, efecto que no fue cuantificado en esta tesis en ratas madre sin tratamiento farmacológico (tabla 4, figura 20).

Para la segunda fase del experimento fueron evaluadas las ratas macho adultas, hijos de las ratas hembra usadas durante la primera fase del experimento. En la prueba de LEC se identificó un estado basal de ansiedad en las ratas macho que recibieron Dz durante su desarrollo (machos-Dz) al compararlos con aquellos animales que no recibieron ningún tratamiento farmacológico durante su desarrollo (tabla 5, figura 21). Por otro lado al evaluar la susceptibilidad para generar crisis convulsivas en ratas macho que fueron expuestas a Dz durante su desarrollo, estas no presentaron cambios

significativos con respecto a las ratas que no fueron expuestas a Dz durante su desarrollo (tabla 7, figura 22).

Los datos obtenidos en la prueba de CPL permiten un análisis cuantitativo: las ratas macho-Dz durante su desarrollo y dentro de la caja de CPL se les administró solución salina en ambos compartimentos preferido “negro” y no preferido “blanco”, al final del tratamiento prefirieron el compartimento “neutro” el cual no estuvo asociado con la administración solución salina (tabla 8, figura 23), esta conducta fue similar a la presentada por el grupo de ratas macho que no recibieron Dz durante su desarrollo (tabla 9, figura 24).

En este contexto, cuando a las ratas macho expuestas a Dz durante su desarrollo se les administró morfina (1mg/Kg) en el compartimento menos preferido y solución salina en el compartimento preferido de la caja de CPL, cuantificamos un cambio de preferencia por el compartimento pareado con morfina (1mg/Kg), efecto que no fue observado en ratas que no fueron expuestas a Dz durante su desarrollo. A otro grupo de ratas se les administró morfina se les administró morfina (5mg/Kg) en este grupo se obtuvo un efecto equiparable al de las ratas macho-Dz (tabla 8, figura 23). Es decir, ratas macho expuestas a Dz durante su desarrollo y que son expuestas a una dosis baja de morfina presentan mayor *craving* con respecto a las ratas sin exposición a Dz, pero con una dosis de morfina 5 veces mayor (tabla 9, figura 24).

### **8.1 – La interrupción abrupta de un tratamiento crónico con Dz genera un síndrome de abstinencia en ratas madre: evaluación de la ansiedad.**

Debido a que la presente tesis tuvo como objetivo principal correlacionar el tratamiento crónico de Dz y la facilitación para adquirir la adicción a morfina en los roedores hijos de ratas gestantes; nuestros resultados muestran que la evaluación de la ansiedad en las ratas madre es un parámetro para identificar que el tratamiento con Dz es suficiente para generar cambios en la conducta de las madres así como modificar la conducta, la excitabilidad cortical y la generación de adicción a morfina en sus crías. La aparición y la evaluación de la ansiedad es un parámetro cuantitativo de que el tratamiento farmacológico con la BZD tuvo impacto negativo en la plasticidad neuronal de las ratas madre.

En conjunto los resultados muestran que las ratas hembras (en estado gestante y asociado a la etapa de lactancia) son susceptibles de inducir un síndrome de abstinencia como consecuencia de la interrupción abrupta de un tratamiento crónico con Dz (fig 20; barras rojas).

La evaluación de la ansiedad que caracteriza a este síndrome fue cuantificada por medio del LEC, a partir de la medición de dos criterios básicos: 1) incremento en el tiempo de permanencia en los BC (15%) asociado a una reducción en el tiempo de permanencia en los BA (46%) y 2) el incremento en el porcentaje de entradas a los BC (30%) también acompañado por la reducción en el porcentaje de entradas a los BA (45%), comparado con animales control (fig. 20), los promedios  $\pm$  error estándar así como la evaluación de la prueba estadística ANOVA marcó la significancia estadística entre estos grupos quedando de manifiesto cuantitativamente la ansiedad en las ratas madre.

Datos previos en nuestra línea de investigación muestran que diversas drogas (GABA, alcohol y neuroesteroides) que reconocen al receptor GABA<sub>A</sub> son capaces de inducir síndromes de abstinencia cuando estas son interrumpidas en su administración (Smith, et al., 1998; Spies, et al., 2003). Sin embargo, los síndromes de abstinencia de estas drogas muestran diferentes características conductuales (Mellerio, 1980) y electrofisiológicas (Wala, et al., 1999). Las abstinencias a BZDs (Dz y flunitrazepam) son las que más se relacionan con cambios electroencefalográficos (aparición de descargas epileptiformes en el EEG; así como las propiedades de disparo de neuronas piramidales tendientes a descargas en ráfaga y modificaciones en el umbral de disparo) y conductuales (aparición de ansiedad, depresión y modificaciones importantes en la

conducta sexual). Diversos grupos de investigación soportan también estos hallazgos: mostrando la abstinencia a las BZDs como un modelo de inducción de cambios sinápticos tendientes a un incremento reversible de la excitabilidad neuronal.

¿Cuál es el mecanismo inductor de estos cambios en la hiperexcitabilidad neuronal que se traduce en la aparición de la ansiedad? El común denominador de estas abstinencia son: A) en la etapa temprana hay una reducción en la síntesis y en la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> principalmente en corteza cerebral e hipocampo (Casasola, et al., 2001); B) una disminución en la síntesis y liberación de GABA (Calixto, et al., 2000; Salazar, et al. 1994); C) eventualmente cambios en la expresión y ensamblaje de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> (Rudolph, et al., 1999; Impagnatiello, et al., 1996; Longone, et al., 1996; Follesa, et al., 2001; Uusi-Oukari y Korpi, 2010); D) incremento en la expresión y actividad de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L y T (Katsura, et al., 2007); y E) modificaciones tardías de otros receptores a neurotransmisores como el incremento de los receptores AMPA/NMDA glutamatergicos (Izzo, et al., 2001; Allison, et al., 2005; Xiang y Tietza, 2007; Shen y Tietz, 2011), incremento en los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos, aumento en la expresión de los receptores dopaminérgicos y alteraciones en la liberación de serotonina (Langen y Rundfeldt, 2007; Authier et al, 2009; Caputo y Bernardi, 2010; Uzun et al, 2010). En conjunto o por separado estos cambios sinápticos han sido estudiados en nuestro laboratorio validando la concentración y el tiempo utilizado de Dz con el cual se trabajó en esta tesis. En resumen, las diversas investigaciones realizadas indican que el componente conductual de las modificaciones sinápticas GABAérgicas son la aparición de una disminución del tono inhibitorio en etapas tempranas y en forma tardía el incremento de la actividad de otras neurotransmisiones.

Es importante mencionar que las ratas hembras de este grupo fueron tratadas con Dz durante los periodos de gestación y en la lactancia, lo cual puede ser un factor que modifica la farmacocinética y farmacodinamia de la BZD utilizada. Por una parte las ratas preñadas tienen un incremento significativo en la producción de neuroesteroides pregnanos (progesterona y alopregnanolona), lo cual puede potenciar el efecto GABAérgico del Dz, incrementando los efectos de la inducción de la abstinencia (Robinson y Stewart, 1986; Zheng, 2009; Frye, et al., 2011). Sin embargo, es sabido que el Dz es un inductor microsomal hepático lo cual permite un incremento en la biotransformación del Dz reduciendo significativamente en días la biodisponibilidad de la BZD reduciendo su efecto farmacológico (Parker, et al., 2006). Este evento reduciría

la eficacia de la BZD. Los datos de la presente tesis muestran contundentemente que las ratas hembras después de 36 días manifiestan una ansiedad, la cual depende directamente de la interrupción del tratamiento crónico de Dz.

El Dz puede atravesar diversas barreras biológicas en el organismo entre ellas la barrera placentaria, por esta razón y no obstante que no se realizaron mediciones de Dz plasmáticas, la aparición de la ansiedad en las madres indica el efecto del Dz y que este se encuentra en la circulación feto-placentaria en formación así como en la organogénesis temprana de las crías. Investigaciones previas identifican el poder teratogénico que tienen las BZDs (Iqbal, et al., 2002; Neutel, 2005; Leppée, et al. 2010; Marinucci, et al., 2011). No obstante a que no fueron presentados estos datos en la sección de los resultados, se tuvieron animales con datos de malformaciones cardíacas asociados a mortalidad temprana en las crías, retraso en el desarrollo al nacer y durante la juventud de las crías (baja talla y peso) en una proporción del 90%. Es por esto, que el efecto sobre las madres y la generación de teratogénesis puede asociarse a que el Dz atravesó la barrera feto-placentaria en las ratas en gestación.

## **8.2 – La exposición de Dz durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano, genera un estado de ansiedad en las ratas macho adultas.**

Al corroborar la efectividad del Dz para generar plasticidad en la neurotransmisión GABAérgica de las ratas madre (perfil ansiogénico). Se estudiaron las posibles alteraciones conductuales en las ratas cría (ratas macho) a una edad adulta al ser expuestas a Dz durante su desarrollo fetal y posnatal temprano. Diversas investigaciones publicadas soportan la idea que trastornos de la personalidad como la ansiedad y la depresión predisponen a los sujetos a generar adicciones (Robinson y Berridge, 2001; Camí y Farré, 2003; Robinson y Berridge, 2008). Este fue uno de los puntos centrales que estudio la presente tesis.

Los resultados de esta tesis indican que las ratas macho expuestas a Dz durante su desarrollo temprano a través de sus madres, muestran en la edad adulta un importante grado de ansiedad con un perfil semejante al cuantificado en sus madres (fig. 21; barras rojas).

La evaluación de la ansiedad cuantificada en el LEC, fue semejante a la realizada en las madres. En este caso los hijos de estas ratas también muestran una ansiedad muy marcada. Estos animales tienen un incremento en el tiempo de permanencia en los BC (18%) asociado a una reducción en el tiempo de permanencia en

los BA (51%; fig.21). No obstante a que la evaluación fue hecha 61 días después del retiro abrupto de Dz a las madres, estos animales muestran un perfil significativo de ansiedad.

Un tratamiento con Dz durante el desarrollo prenatal y posnatal temprano tiene un impacto negativo en la plasticidad del sistema de neurotransmisión GABAérgico en las crías similar al presentado por sus madres.

Al igual que en nuestros resultados, diversos autores coinciden en que algunas de las alteraciones conductuales más frecuentes en estos animales incluyen la reactividad al estrés, baja interacción social, conductas de indefensión y conductas de ansiedad, medidas con diversas pruebas (Cannizzaro, et al., 1995, 2001, 2002), estos fenómenos han sido encontrados con mayor frecuencia en machos que en hembras (Kellogg, et al., 1991).

Diversas investigaciones soportan la idea que exposiciones a BZDs durante el desarrollo prenatal o posnatal están asociadas con retaso en el desarrollo (Iqbal, et al., 2002; Neutel, 2005; Leppée, et al. 2010; Marinucci, et al., 2011), así como alteraciones en las respuestas conductuales, neurales, hormonales e inmunes ante estímulos ambientales, dichas alteraciones se presentan con mayor fuerza después del comienzo de la pubertad (Kellogg, 1999).

No se conoce el mecanismo directo por el cual se da este proceso de plasticidad neuronal a largo plazo sin embargo, se han propuesto posibles mecanismos involucrados en la generación de la ansiedad en las ratas hijas de madres tratadas con BZDs. A) Disminución en la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> en la corteza cerebral, el tallo cerebral, el telencéfalo y el hipotálamo (Kellogg, et al. 2001; Roberts, et al. 2001); B) Cambios en la estructura conformacional y expresión de las subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> (Cannizzaro, et al. 2002; Picard, et al. 2008); C) Cambios en la sensibilidad farmacológica: disminución o modificación de los sitios de unión para BZDs, GABA y neuroesteroides en el receptor GABA<sub>A</sub>, atenuando la acción de estos agonistas GABAérgicos sobre el canal de Cl<sup>-</sup> (Miller, et al., 1988; Miller, et al., 1989; Rothe y Bigl, 1989; Cannizzaro, et al., 1995, 2001, 2005); D) Modificaciones en otras neurotransmisiones y cambios en respuestas hormonales. Se ha identificado que en condiciones semejantes a las realizadas en esta tesis se presenta el incremento en la liberación de noradrenalina en el hipotálamo e hipocampo, una mayor concentración de corticoesterona plasmática (Simmons, et al., 1984; Martire, et al., 2002), alteraciones en los receptores β-adrenérgicos en la corteza cerebral, estriado e hipotálamo (Rothe y

Langer, 1988). Alteraciones semejantes en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal también han sido cuantificadas con la administración prenatal de otras drogas GABAérgicas como el alcohol (Champagne, et al., 2001; Zhang, et al., 2005; Wilcoxon et al., 2005).

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren, que el tratamiento crónico de Dz en la etapa intrauterina induce modificaciones sinápticas cuyo impacto farmacológico y conductual es permanente.

### **8.3 – La susceptibilidad para generar crisis convulsivas no se modifica por la exposición prenatal y posnatal de Dz.**

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que las ratas macho expuestas a Dz durante su desarrollo y que manifiestan datos de ansiedad en la etapa adulta, no modifican el umbral para generar crisis convulsivas inducidas por PTZ (fig. 22; barras rojas). Datos previos de nuestro laboratorio muestran, que en animales macho de la misma edad con una exposición aguda de Dz (7mg/Kg; durante 10 días), generan ansiedad y un incremento en la susceptibilidad de inducción de crisis convulsivas en los primeros estadios de la abstinencia a Dz (24 horas después de la interrupción del tratamiento). Esos animales, a nivel electroencefalográfico muestran en los primeros días de abstinencia, una actividad epileptiforme caracterizada por la aparición de complejos espiga-onda en las regiones fronto-parietales (Cornejo, 2011). Es decir, previamente nosotros corroboramos que la interrupción del tratamiento agudo con Dz desarrolla un estado de hiperexcitabilidad neuronal, que al aplicarle un antagonista GABAérgico a dosis subumbral (PTZ; 30mg/Kg) fue suficiente para inducir crisis tónico-clónicas generalizadas. En este contexto, nosotros identificamos que no obstante a la interrupción del tratamiento con Dz sea aguda en animales adultos o en etapas de gestación y lactancia, se logra inducir ansiedad, sin embargo, la vulnerabilidad para generar crisis convulsivas sólo se cuantifica en la abstinencia aguda y no en un proceso de plasticidad a largo plazo.

Los datos encontrados en esta investigación son consistentes con otras evidencias publicadas previamente, las cuales señalan que la exposición prenatal de BZDs no afecta el umbral para generar crisis convulsivas en ratas macho adultas por la administración de PTZ, sin embargo, este efecto si es cuantificable con otros antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (bicuculina, DMCM y pricotoxina; Bitran, et al., 1991; Cannizzaro, et al., 1995, 2001). Es posible que los cambios reportados se deban a

la acción farmacológica diferencial del PTZ, en las neurotransmisiones GABAérgica y glutamatérgica (Doi, et al. 2009).

¿Por qué se inducen cambios en la ansiedad de las ratas expuestas a Dz durante su desarrollo y no modifica el umbral de inducción de crisis convulsivas? Los resultados de la presente tesis sugieren que la ansiedad es un efecto de plasticidad neuronal a largo plazo, sin embargo, el nulo efecto en el umbral de inducción de crisis convulsivas indica un cambio sináptico de latencia y duración corta.

Datos previos de nuestro laboratorio y diversas publicaciones en la literatura indican que las abstinencias a drogas GABAérgicas modifican en forma aguda la síntesis de GABA (Calixto, et al., 2000; Salazar, et al. 1994), la expresión de receptores e integración de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> cambiando la sensibilidad farmacológica del receptor a muy corto plazo (Rudolph, et al., 1999; Impagnatiello, et al., 1996; Longone, et al., 1996; Follesa, et al., 2001; Uusi-Oukari y Korpi, 2010); sin embargo, a mediano y largo plazo en estos síndromes de abstinencia se asocian a cambios en otras neurotransmisiones (Langen y Rundfeldt, 2007; Authier et al, 2009; Caputo y Bernardi, 2010; Uzun et al, 2010). Es decir, que en el síndrome de abstinencia a Dz primero se suscitan modificaciones GABAérgicas sobre las cuales eventualmente se integran los cambios de otras neurotransmisiones. Es posible que los cambios sinápticos a largo plazo se asistan de modificaciones sinápticas como: la glutamatérgica, la serotoninérgica, la adrenérgica y la dopaminérgica. El proceso de la ansiedad es crónico y registrable después de 61 días de la última administración de Dz, esto sugiere que este trastorno tiene sustratos neurofisiológicos y neuroquímicos diversos. En contraste, la modificación al umbral de crisis convulsivas es agudo y más relacionado con modificaciones GABAérgicas puntuales.

#### **8.4 – La exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano incrementa la susceptibilidad para inducir adicción a morfina en ratas macho.**

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la exposición de Dz en etapas del desarrollo prenatal y posnatal, favorece en ratas adultas la adicción a morfina (fig. 23), cumpliendo con esto el objetivo general planteado inicialmente. El estudio conductual de la adicción en esta tesis fue realizado mediante el modelo del condicionamiento de preferencia de lugar (CPL), el cual tiene como paradigma, combinar las propiedades motivacionales de un fármaco, con una serie de estímulos ambientales, los cuales durante el transcurso del condicionamiento adquieren

propiedades motivacionales secundarias, de tal manera que pueden actuar como un estímulo condicionado generando placer o aversión (Tzschentke, 1998; Tzschentke, 2007).

En este estudio farmacológico se utilizaron dos dosis de morfina en grupos independientes: dosis baja (1mg/Kg) y alta (5mg/Kg) en animales control y en animales previamente expuestos a Dz. Los resultados en animales expuestos a Dz indican, que una dosis baja de morfina incrementa significativamente la preferencia por el compartimento asociado con esta droga que previamente era aversivo (fig. 23). A diferencia de los animales control que sólo mostraron este cambio cuando se trataron con dosis altas del opioide (fig. 23). Esto indica que los animales tratados con Dz durante su desarrollo prenatal y posnatal farmacológicamente son más susceptibles de adquirir una adicción con dosis pequeñas de morfina.

No existen evidencias científicas publicadas que correlacionen el efecto prenatal de las drogas de abuso GABAérgicas, con modificaciones en la susceptibilidad para generar una adicción. No obstante que la alteración del sistema opioide y dopaminérgico en etapas tempranas del desarrollo si hipersensibilizan para la facilitación de la adicción a estas drogas en etapas adultas, es decir, la exposición prenatal de morfina y cocaína inducen alteraciones en la evaluación de las propiedades reforzantes de estas drogas (Mattson, et al., 2003; Stanwood y Levitt, 2003).

Nosotros hemos discutido que los cambios inducidos por el tratamiento con Dz en etapas tempranas, modifican en forma aguda la actividad GABAérgica y eventualmente se asocian cambios de otras neurotransmisiones como la glutamatérgica, la dopaminérgica, la adrenérgica y la serotoninérgica (Langen y Rundfeldt, 2007; Authier et al, 2009; Caputo y Bernardi, 2010; Uzun et al, 2010). ¿Cómo puede este evento de modificaciones en la neurotransmisión cambiar o favorecer la adquisición de adicción a un opioide? La neurotransmisión GABAérgica modula el desarrollo de diversas neurotransmisiones en el cerebro en formación, se conoce que el GABA tiene efecto trófico en las neuronas monoaminérgicas del tallo cerebral (Liu et al., 1997; Lauder, et al., 1998; Behar, et al., 2000; Verney, 2003). La exposición prenatal con Dz, se ha asociado con modificaciones en las respuestas conductuales, hormonales y respuestas inmunológicas a estresores, además de generar teratogénesis y retrasos en el desarrollo, lo cual puede ser evaluado hasta la pubertad (Kellogg, 1999).

Específicamente la administración prenatal y posnatal de Dz genera cambios en el sistema GABAérgico que impactan en la edad adulta como: (1) la disminución en la

expresión de receptores GABA<sub>A</sub> en la corteza cerebral, el tallo cerebral y el hipotálamo (Kellogg, et al. 2001; Roberts, et al. 2001); (2) cambios en la estructura conformacional de los receptores GABA<sub>A</sub> (Cannizzaro, et al. 2002; Picard, et al. 2008); y (3) la disminución en los sitios de unión para BZDs, GABA y neuroesteroides en el receptor atenuando la acción de estos agonistas sobre el canal de Cl<sup>-</sup> (Miller, et al., 1988; Miller, et al., 1989; Rothe y Bigl, 1989; Cannizzaro, et al., 1995, 2001, 2005).

Los receptores GABA<sub>A</sub> están relacionados con efectos de dependencia a drogas de abuso (Tan, et al., 2010; Tan, et al., 2011), estos receptores son importantes en la modulación de las aferencias del NAc, el VTA y la interacción dinámica entre ellos (figura 12; Hyman y Malenka, 2001; Koob y Le Moal, 2001; Goldstein y Volkow, 2002; Kalivas y Volkow, 2005; Hyman, et al. 2006). Estas proyecciones funcionan como un mecanismo de retroalimentación negativa del neurocircuito del reforzamiento (figura 12; Nestler, 2001; Billa, et al., 2010; Wee y Koob, 2010; Xia, et al., 2011). Drogas como la morfina, obtienen su efecto reforzante, promoviendo la liberación de dopamina en el VTA y disminuyendo la actividad inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas del NAc que proyectan hacia el VTA (figura 13; De Vries y Shippenberg, 2002; Nugent, et al., 2007). Los resultados de esta tesis sugieren que la vulnerabilidad para desarrollar drogadicción en animales expuestos a Dz durante su desarrollo, puede deberse a una desregulación de los mecanismos de recompensa, modulados directamente por la actividad GABAérgica (Koob y Moal, 1997; Koob y Le Moal, 2001). Es decir, los cambios cuantificados en esta tesis es posible se deban a que la exposición repetida de Dz reduzcan la actividad en las neuronas del NAc que hacen que el sistema de reforzamiento sea más excitable lo que puede conducir a una condición de reforzamiento proporcional al incentivo del estímulo. Es decir se genera una desinhibición de las neuronas dopaminérgicas del VTA facilitando un fenómeno de adicción.

Estos cambios pueden dar como consecuencia, que el ciclo de retroalimentación positiva en el cual se encuentra el sistema de recompensa bajo la administración de una droga, induzca que el umbral hedónico (el punto en el que el placer es alcanzado) cambie continuamente. Es decir, el estado de desregulación en el sistema de recompensa puede desencadenar el consumo compulsivo de alguna droga y por consecuencia la adicción (Koob y Moal, 1997).

## **IX – CONCLUSIONES**

- Las ratas hembras en periodos de gestación y lactancia que recibieron un tratamiento crónico con Dz inducen la aparición de un síndrome de abstinencia el cual se caracteriza por la aparición de ansiedad.
- La exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano en ratas macho genera un estado de ansiedad el cual perdura hasta la edad adulta.
- La exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano en ratas macho, no favorece la inducción de crisis convulsivas ante la administración de PTZ.
- La exposición a Dz durante el desarrollo fetal y posnatal temprano en ratas macho, favorece el cambio de preferencia de lugar en una caja de CPL, este hecho se relaciona con la desarrollo de adicción a morfina.

## X - REFERENCIAS

- Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Reviews*, 59, 253-277.
- Allison C, Pratt J, Ripley T, Stephens D. (2005). alpha-Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptor autoradiography in mouse brain after single and repeated withdrawal from diazepam. *The european journal of neuroscience*, 21 (4), 1045-1056.
- Ator NA. (2005). Contributions of GABA<sub>A</sub> Receptor Subtype Selectivity to Abuse Liability and Dependence Potential of Pharmacological Treatments for Anxiety and Sleep Disorders. *CNS Spectrums*, 10 (1), 31-39.
- Austin M-PV, Mitchell PB. (1998). Psychotropic medications in pregnant women: treatment dilemmas. *The Medical Journal of Australia*, 169 (8), 428-431.
- Authier N, Balayssac D, Sautereau M, Zangarelli A, Courty P, Somogyi AA, Vennat B, Llorca PM, Eschalier A. (2009) Benzodiazepine dependence: focus on withdrawal syndrome. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 67(6), 408-13.
- Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL. (2000). GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cerebral Cortex*, 10 (9), 899-909.
- Billa SK, Xia Y, Morón JA. (2010). Disruption of morphine-conditioned place preference by a  $\delta$ 2-opioid receptor antagonist: study of  $\mu$ -opioid and  $\delta$ -opioid receptor expression at the synapse. *European Journal of Neuroscience*, 32 , 625–631.
- Bitran D, Primus RJ, Kellogg, CK. (1991). Gestational exposure to diazepam increases sensitivity to convulsants that act at the GABA/benzodiazepine receptor complex. *European Journal of Pharmacology*, 196 (3), 223-231.
- Bolin PJ, DaVanzo, JP. (1982). The Influence of Isolation and Aminoxyacetic Acid (AOAA) on GABA in Muricidal Rats. *Psychopharmacology*, 76, 367-370.
- Bonci A, Malenka RC. (1999). Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 19 (10), 3723–3730.
- Bonnin A, Torii M, Wang L, Rakic P, Levitt P. (2007). Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nature Neuroscience*, 10, 588 - 597.
- Brailowsky S. (1995). *Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología*. México D.F., México: La ciencia/130 desde México. 84-87, 199-206
- Brazel CY, Nuñez JL, Yang Z, Levison SW. (2005). Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. *Neuroscience*, 131 (1), 55-65.

- Calixto E, López-Colomé AM, Casasola C, Montiel T, Bargas J (2000) Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Research*, 39, 13-26.
- Camí J, Farré M. (2003). Drug addiction. *The New England Journal of Medicine*, 349 (10), 975-986.
- Cannizzaro C, Cannizzaro E, Gagliano M, Mineo A, Sabatino M, Cannizzaro G. (1995). Effects of desipramine and alprazolam on forced swimming behaviour of adult rats exposed to prenatal diazepam. *European Journal of Pharmacology*, 273, 239-245.
- Cannizzaro C, Martire M, Cannizzaro E, Provenzano G, Gagliano M, Carollo A, Mineo A, Steardo L. (2001). Long-lasting handling affects behavioural reactivity in adult rats of both sexes prenatally exposed to diazepam. *Brain Research*, 904, 225–233.
- Cannizzaro C, Martire M, Steardo L, Gagliano M, Mineo A, Provenzan G, (2002). Prenatal exposure to diazepam and alprazolam, but not to zolpidem, affects behavioural stress reactivity in handling-naïve and handling-habituated adult male rat progeny. *Brain Research*, 953, 170–180.
- Cannizzaro E, Martire M, Gagliano M, Plescia F, La Barbera M, Mantia G, Mineo A, Cannizzaro G, Cannizzaro C (2005). Reversal of prenatal diazepam-induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 161, 320–330.
- Caputo F, Bernardi M. (2010) Medications acting on the GABA system in the treatment of alcoholic patients. *Current Pharmaceutical Design*. 16 (19), 2118-25. Review
- Carlezon Jr WA, Wise RA. (1996). Rewarding Actions of Phencyclidine and Related Drugs in Nucleus Accumbens Shell and Frontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 76 (9), 3112-3122.
- Carlezon Jr WA, Boundy VA, Haile CN, Lane SB, Kalb RG, Neve RL, Nestler EJ. (1997). Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science*, 277 (5327), 812-814.
- Carlezon WA, Thomas MJ. (2009). Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56 (1), 122–132.
- Carlson NR. (2006). *Fisiología de la Conducta* (8a ed.). Pearson-Addison Wesley. 134, 135, 607-609, 636-648
- Carmona E, Gomes C, Trolin G. (1980). Effect of Aminoxyacetic Acid (AOAA) on GABA levels in Some Parts of Rat Brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 312, 51-55.
- Carr DB, Sesack SR. (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20 (10), 3864–3873.

- Casasola C, Bargas J, Arias-Montaña JA, Calixto E, Montiel T, Galarraga E, Brailowsky S (2001). Hippocampal hyperexcitability induced by GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Epilepsy Research*, 47, 257-271.
- Champagne F, Meaney MJ. (2001). Like mother, like daughter: evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. *Progress in Brain Research*, 133, 287–302.
- Chao J, Nestler EJ. (2004). Molecular neurobiology of drug addiction. *Annual Review of Medicine*, 55, 113-132.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. (2001). Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, 105 (1), 7-17.
- Clark SM, Di Leo R, Dhanoa PK, Van Cauwenberghe OR, Mullen RT, Shelp BJ. (2009). Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis gamma-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6), 1743–1757.
- Cornejo JM. (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*. México, D.F.
- Costa E, Auta J, Grayson DR, Matsumoto K, Pappas GD, Zhang X, Guidotti A. (2002). GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepines: a role for dendritic resident subunit mRNAs. *Neuropharmacology*, 43, 925–937.
- De Vries TJ, Shippenberg TS. (2002). Neural Systems Underlying Opiate Addiction. *The Journal of Neuroscience*, 22 (9), 3321–3325.
- DeLorcy T, Olsen R. (1994). GABA and glycine. G. Siegel, B. Agranoff, B. Molinoff, *Basic neurochemistry*. New York, USA: Raven press.
- Deng L, Yao J, Fang C, Dong N, Luscher B, Chen G. (2007). Sequential Postsynaptic Maturation Governs the Temporal Order of GABAergic and Glutamatergic Synaptogenesis in Rat Embryonic Cultures. *The Journal of Neuroscience*, 27 (40), 10860-10869.
- Deutch A, Roth R. (1999). Neurotransmitters. Zigmond M, Bloom F, Landis S, Roberts J, Squire L, *Fundamental Neuroscience*. California USA.
- Di Chiara G. (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *European Journal of Pharmacology*, 375 (1-3), 13-30.
- Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore LJ. (2009). Role of glutamate and GABA transporters in development of pentylenetetrazol-kindling. *Neurochemical Research*, 34(7),1324-31.
- Dong Y, Green T, Saal D, Marie H, Neve R, Nestler EJ, Malenka RC. (2006). CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nature Neuroscience*, 9, 475-477.

- Emmett-Oglesby MW, Mathis DA, Moon RT, Lal H. (1990). Animal models of drug withdrawal symptoms. *Psychopharmacology*, 101 (3), 292-309.
- Feldman RS, Quenzer LF. (1984). *Fundamentals of Neuropsychopharmacology*. Sinauer Associates Inc.
- Ferdyn-Drosik M, Nowak P, Bojanek K, Michat B, Kasperski J, Skaba D, Muchacki R, Kostrzewa RM. (2010). Neonatal DSP-4 treatment impairs 5-HT(1B) receptor reactivity in adult rats. Behavioral and biochemical studies. *Pharmacological Reports*, 62 (4), 608-620.
- Flórez J, Pazos A. (2008). *Farmacología humana* (Quinta edición ed.). ELSEVIER-MASSON.
- Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, Massa F, Desole MS, Carta M, Busonero F, Sanna E, Biggio G. (2001). Increase in expression of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 4 subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists. *Molecular Brain Research*, 15;92 (1-2), 138-48.
- Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G. (2006). Neurosteroids, GABA<sub>A</sub> receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacology*, 186, 267–280.
- Fride E, Weinstock M. (1989). Alterations in behavioral and striatal dopamine asymmetries induced by prenatal stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 32 (2), 425-430.
- Frieder B, Epstein S, Grimm V. (1984). The effects of exposure to diazepam during various stages of gestation or during lactation on the development and behavior of rat pups. *Psychopharmacology (Berl)*, 83 (1), 51-55.
- Friedman J, Polifka J. (2000). *Teratogenic Effects of Drugs: A Resource for Clinicians (TERIS)* (2nd ed. ed.). Baltimore: MD: The Johns Hopkins University Press.
- Frye CA, Hirst JJ, Brunton PJ, Russell JA. (2011). Neurosteroids for a successful pregnancy. *Stress*, 14 (1), 1–5.
- Goldstein RZ, Volkow ND. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *The American Journal of Psychiatry*, 159 (10), 1642-1652.
- Griebel G, Perrault G, Sanger D. (1998). Limited anxiolytic-like effects of non-benzodiazepine hypnotics in rodents. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 12 (4), 356-365.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S. (1994). Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 6 (3), 341-345.
- Hoffman DC. (1989). The Use of Place Conditioning in Studying the Neuropharmacology of Drug Reinforcement. *Brain Research Bulletin*, 23, 373-387.
- Hyman S, Malenka R. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2 (10), 695-703.

- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. (2006). Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29, 565–598.
- Iqbal MM, Sobhan T, Ryals T. (2002). Effects of commonly used benzodiazepines on the fetus, the neonate, and the nursing infant. *Psychiatric Services*, 53(1), 39-49.
- Impagnatiello F, Pesold C, Longone P, Caruncho H, Fritschy J, Costa E, Guidotti A. (1996). Modifications of gamma-aminobutyric acid A receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to diazepam. *Molecular Pharmacology*, 49 (5), 822-31.
- Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E. (2001). Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (6), 3483-3488.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. (2008). GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 331-343.
- Jakowec MW, Jackson-Lewis V, Chen X, Langston WJ, Przedborski S. (1998). The Postnatal Development of AMPA Receptor Subunits in the Basal Ganglia of the Rat. *Developmental Neuroscience*, 20 (1), 19-33.
- Jongsma ML, van Rijn CM, Egmond Jv, van Schaijk WJ, Sambeth A, Coenen AM. (2000). The influence of diazepam on the electroencephalogram-evoked potential interrelation in rats. *Neuroscience Letters*, 293 (2 (27)), 83-86.
- Jonker DM, Voskuyl RA, Danhof M. (2007). Synergistic combinations of anticonvulsant agents: what is the evidence from animal experiments? *Epilepsia*, 48 (3), 412-434.
- Jung ME, Lal H, Gatch MB. (2002). The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26 (4), 429-439.
- Kalivas PW, Volkow ND. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *The American Journal Psychiatry*, 162 (8), 1403-1413.
- Kandel ER, Harris Schwartz J, Thomas MJ (2000). *Principles of Neural Science* (4a ed.). McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Kardos J. (1999). Recent advances in GABA research. *Neurochemistry International*, 34, 353-358.
- Katsura M., Shibasaki M, Kurokawa K, Tsujimura A, Ohkuma S (2007). Up-regulation of L-type high voltage-gated calcium channel subunits by sustained exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in cerebrocortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103 (6), 2518-2528.
- Kauer JA, Malenka RC. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 8 (11), 844-858.

- Kellogg CK, Primus RJ, Bitran D (1991). Sexually dimorphic influence of prenatal exposure to diazepam on behavioral responses to environmental challenge and on gamma-aminobutyric acid (GABA)-stimulated chloride uptake in the brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256(1), 259-65.
- Kellogg CK, Taylor MK, Rodriguez-Zafra M, Pleger GL. (1993). Altered Stressor-Induced Changes in GABAA Receptor Function in the Cerebral Cortex of Adult Rats Exposed In Utero to Diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 267-273.
- Kellogg CK. (1999). Sex Differences in Long-Term Consequences of Prenatal Diazepam Exposure: Possible Underlying Mechanisms. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64 (4), 673–680.
- Kellogg CK, Yao J, Pleger GL. (2000). Sex-specific effects of in utero manipulation of GABA(A) receptors on pre- and postnatal expression of BDNF in rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 121(2), 157-67.
- Kellogg CK, Kenjarski TP, Pleger GL, Frye CA. (2006). Region-, age-, and sex-specific effects of fetal diazepam exposure on the postnatal development of neurosteroids. *Brain Research*, 1067 (1), 115-125.
- Koff JM, Miller LG. (1995). Prenatal lorazepam exposure: 4. Persistent alterations in pentylenetetrazole-induced seizure threshold and GABA-dependent chloride uptake after prenatal lorazepam exposure. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 51 (4), 721-724.
- Koob GF, Le Moal M. (1997). Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science*, 278 (5335), 52-58.
- Koob GF, Le Moal M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24, 97-129.
- Koob GF, Volkow ND. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35 (1), 217-238.
- Krnjević K. (1997). Role of GABA in cerebral cortex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75 (5), 439-451.
- Kuriyama K, Hirouchi M, Nakayasu H. (1993). Structure and function of cerebral GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. *Neuroscience Research*, 17 (2), 91-99.
- Langen B, Rundfeldt C. (2007). ELB139 an agonist at the benzodiazepine binding site increases 5-HT in the striatum and prefrontal cortex of rats: a microdialysis study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 86, 79–85.
- Langtry H, Benfield P. (1990). Zolpidem. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs*, 40 (2), 291-313.
- Lauder JM, Liu J, Devaud L, Morrow AL. (1998). GABA as a trophic factor for developing monoamine neurons. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, 5 (2-3), 247-259.

- Lenard NR, Daniels DJ, Portoghese PS, Roerig SC. (2007). Absence of conditioned place preference or reinstatement with bivalent ligands containing mu-opioid receptor agonist and delta-opioid receptor antagonist pharmacophores. *European Journal of Pharmacology*, 566, 75–82.
- Leppée M, Culig J, Eric M, Sijanovic S. (2010). The effects of benzodiazepines in pregnancy. *Acta Neurologica Belgica*, 110 (2), 163-167.
- Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy HE. (1997). New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends in Neurosciences*, 20 (6), 269-274.
- Licata SC, Rowlett JK. (2008). Abuse and Dependence Liability of Benzodiazepine-Type Drugs: GABA<sub>A</sub> Receptor Modulation and Beyond. *Pharmacol Biochem Behav*, 9 (1), 74–89.
- Liu Bai (2009). Molecular mechanisms underlying neural circuit formation. *Current Opinion in Neurobiology*, 19(2), 162–167
- Liu J, Morrow LA, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM. (1997). GABA<sub>A</sub> Receptors Mediate Trophic Effects of GABA on Embryonic Brainstem Monoamine Neurons In Vitro. *The Journal of Neuroscience*, 17 (7), 2420–2428.
- Liu J, Brannen KC, Grayson DR, Morrow LA, Devaud LL, Lauder JM. (1998). Prenatal exposure to the pesticide dieldrin or the GABA<sub>A</sub> receptor antagonist bicuculline differentially alters expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in fetal rat brainstem. *Developmental Neuroscience*, 20 (1), 83-92.
- Loh E-W, Ball D. (2000). Role of the GABA<sub>A</sub>β2, GABA<sub>A</sub>α6, GABA<sub>A</sub>α1 and GABA<sub>A</sub>γ2 receptor subunit genes cluster in drug responses and the development of alcohol dependence. *Neurochemistry International*, 37, 413-423.
- Malgorzata F, Malgorzata F. (2008). GABA<sub>B</sub> receptors in drug addiction. *Pharmacological Reports*, 60, 755–770.
- Manchikanti L, Brown KR, Pharm D, Singh V. (2002). National All Schedules Prescription Electronic Reporting Act (NASPER): Balancing Substance Abuse and Medical Necessity. *Pain Physician*, 5 (3), 294-2319.
- Marinucci L, Balloni S, Carinci F, Locci P, Pezzetti F, Bodo M. (2011). Diazepam effects on non-syndromic cleft lip with or without palate: epidemiological studies, clinical findings, genes and extracellular matrix. *Expert Opinion on Drug Safety*, 10 (1), 23-33.
- Martín-García E, Darbra S, Pallarès M. (2007) Implicaciones de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica. *Revisión en Neurociencias* 44; 661-676.
- Martire M, Altobelli D, Cannizzaro C, Maurizi S, Preziosi P. (2002). Prenatal diazepam exposure functionally alters the GABA<sub>A</sub> receptor that modulates [3H]noradrenaline

- release from rat hippocampal synaptosomes. *Developmental Neuroscience*, 24 (1), 71-78.
- Mattson BJ, Williams SE, Rosenblatt JS, Morrell JI. (2003). Preferences for cocaine- or pup-associated chambers differentiates otherwise behaviorally identical postpartum maternal rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 167 (1), 1–8.
- Mellerio F. (1980). Contribution of electroencephalography in tranquilizer withdrawal syndromes. *Revue d'électroencéphalographie et de neurophysiologie clinique* 10(1):95-103
- McEwen B, Stellar E. (1993). Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*, 27;153 (18), 2093-2101.
- Miller LG, Roy BR, Weill CL, Lopez F. (1989). Persistent alterations in GABA<sub>A</sub> receptor binding and function after prenatal lorazepam administration in the chick. *Brain Research Bulletin*, (23), 171-174.
- Miller LG, Weill CL, Roy BR, Gaver A. (1988). Lorazepam administration during embryonic development alters GABA<sub>A</sub> receptor binding and function. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 44 (2), 241-246.
- Nelson CA, Luciana M. (2008). *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience* (2da ed.). Cambridge, Massachusetts, London, England: A Badford Book The Mit Press.
- Nestler EJ. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nauret Reviews Neuroscience*, 2 (2), 119-128.
- Neutel IC. (2005). The epidemiology of long-term benzodiazepine use. *International Review of Psychiatry*, (17), 189–197.
- Nicosia A, Giardina L, Di Leo F, Medico M, Mazzola C, Genazzani AA, Drago F. (2003). Long-lasting behavioral changes induced by pre- or neonatal exposure to diazepam in rats. *European Journal of Pharmacology*, 469, 103–109.
- Nugent FS, Penick EC, Kauer JA. (2007). Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. *Nature*, (446), 1086-1090.
- Nutt D. (2005). Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectrums*, 10, 49-56.
- O'Brien CP. (2005). Benzodiazepine Use, Abuse, and Dependence. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2005;66 Suppl 2:28-33. , 66 (2), 28-33.
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG. (2003). Dopamine Modulates Cell Cycle in the Lateral Ganglionic Eminence. *The Journal of Neuroscience*, 23 (7), 2840 –2850.
- Omelchenko N, Sesack SR. (2007). Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. *Neuroscience*, 3, 1259-1274.
- Parker KL, Lazo JS, Brunton LL. (2006). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (Undécima edición ed.). McGraw-Hill Interamericana.

- Pellicer F, Ortega-Legaspi J, López Avila A, Coffeen U, Jaimes O. (2009). Dopamine Pathways and Receptors in Nociception and Pain. En Beaulieu P, Lussier D, Porreca F, Dickenson A, *Pharmacology of Pain*, 622.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14 (3), 149-167.
- Peoples L, Kravitz A, Guillem K. (2007). The Role of Accumbal Hypoactivity in Cocaine Addiction. *The Scientific World Journal*, 7 (52), 22–45.
- Pesold C, Caruncho HJ, Impagnatiello F, Berg MJ, Fritschy JM, Guidotti A, Costa E. (1997). Tolerance to diazepam and changes in GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neuroscience*, 79 (2), 477-87.
- Piazza P, Le Moal M. (1998). The role of stress in drug self-administration. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19 (2), 67-74.
- Picard L, Guénin S, Perrin Y, Hilaire G, Larincol N. (2008). Prenatal Diazepam Exposure Alters Respiratory Control System and GABAA and Adenosine Receptor Gene Expression in Newborn Rats. *Pediatric Research*, 64 (1), 44-49.
- Rada P, Hoebel BG. (2005). Acetylcholine in the accumbens is decreased by diazepam and increased by benzodiazepine withdrawal: a possible mechanism for dependency. *European Journal of Pharmacology*, 508, 131–138.
- Rakic P. (1995). A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends in Neuroscience*, 18, 383–388.
- Rang H, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. (2007). *Pharmacology*, Churchill Livingstone Elsevier.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J. (2005). NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Research Bulletin*, 64, 493–503.
- Ribeiro, C., Azevedo, R., Silva, V., & Botega, N. (2007). Chronic use of diazepam in primary healthcare centers: user profile and usage pattern. *Sao Paulo Medical Journal*, 125 (5), 270-274.
- Roberts AA, Pleger GL, Kellogg CK. (2001). Effect of prenatal exposure to diazepam on brain GABA<sub>A</sub> receptor mRNA levels in rats examined at late fetal or adult ages. *Developmental Neuroscience*, 23 (2), 135-144.
- Robinson EG, Stewart DE (1986). Postpartum psychiatric disorders. *Canadian Medical Association Journal*, 134 (1), 31-7.
- Robinson T, Berridge K. (2003). Addiction. *Annual Review of Psychology*, 54, 25-53.
- Rodríguez De Fonseca F, Rubio P, Martín-Calderón JL, Caine BS, Koob GF, Navarro M. (1995). The dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT modulates the acquisition and

- expression of morphine-induced place preference. *European Journal of Pharmacology*, 274, 47-55.
- Roitman MF, Wheeler RA, Carelli RM. (2005). Nucleus Accumbens Neurons Are Innately Tuned for Rewarding and Aversive Taste Stimuli, Encode Their Predictors, and Are Linked to Motor Output. *Neuron*, 45, 587–597.
- Roma PG, Riley AL. (2005). Apparatus bias and the use of light and texture in place conditioning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 82 (1), 163-169.
- Rothe T, Bigl V. (1989). The ontogeny of benzodiazepine receptors in selected regions of the rat brain: effect of perinatal exposure to diazepam. *Neuropharmacology*, 28 (5), 503-508.
- Rothe T, Langer M. (1988). Prenatal diazepam exposure affects beta-adrenergic receptors in brain regions of adult rat offspring. *Journal of Neurochemistry*, (51), 1361-1366.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson J, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific  $\gamma$ -aminobutyric acid (A) receptor subtypes. *Nature*, 401, 796–800.
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC. (2003). Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron*, 37, 577–582.
- Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R. (1994) Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusion of gamma-amino butyric acid. *Neurochemistry International* 24, 363-368.
- Schultz W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 259-288.
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. (1999). Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4 (11), 446-452.
- Shen G, Tietz EI. (2011). Down-regulation of synaptic GluN2B subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors: a physiological brake on CA1 neuron  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hyperexcitability during benzodiazepine withdrawal. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336 (1), 265–273.
- Simmons RD, Miller RK, Kellogg CK. (1984). Prenatal Exposure to Diazepam Alters Central and Peripheral Responses to Stress in Adult Rat Offspring. *Brain Research*, 307, 39-46.
- Sinha R. (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berlin)*, 158 (4), 343-359.
- Smith SS, Gong QH, Xinshe L, Moran MH, Daniel B, Frye CA, Hsu F-C. (1998). Withdrawal from  $3\alpha$ -OH- $5\alpha$ -pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA<sub>A</sub>-gated current and increases the GABA<sub>A</sub> receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. *The Journal of Neuroscience*, 18 (14), 5275-5284.

- Spies CD, Otter HE, Hüske B, Sinha P, Neumann T, Rettig J, Lenzenhuber E, Kox WJ, Sellers EM (2003) Alcohol withdrawal severity is decreased by symptom-orientated adjusted bolus therapy in the ICU. *Intensive Care Medicine*, 29(12), 2230-8.
- Song ZM, Undie AS, Koh PO, Fang Y-Y, Zhang L, Dracheva S, Sealfon SC, Lidow MS. (2002). D1 Dopamine Receptor Regulation of Microtubule-Associated Protein-2 Phosphorylation in Developing Cerebral Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 22 (14), 6092–6105.
- Spanagel R, Weiss F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neuroscience*, 22 (11), 521-527.
- Staley KJ, Proctor WR. (1999). Modulation of mammalian dendritic GABA<sub>A</sub> receptor function by the kinetics of Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport. *The Journal of Physiology*, 519 (3), 693-712.
- Stanwood GD, Levitt P. (2003). Repeated i.v. cocaine exposure produces long-lasting behavioral sensitization in pregnant adults, but behavioral tolerance in their offspring. *Neuroscience* 122, 579–583.
- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in Neurobiology*, 75(6), 406-33
- Tan KR, Brown M, Labouèbe G, Yvon C, Creton C, Fritschy JM, Rudolph U, Lüscher C. (2010) Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*, 463(7282), 769-74.
- Tan KR, Rudolph U, Lüscher C. (2011). Hooked on benzodiazepines: GABA<sub>A</sub> receptor subtypes and addiction. *Trends in Neurosciences*, 34 (4), 188-197.
- Thadani PV. (2002). The intersection of stress, drug abuse and development. *Psychoneuroendocrinology*, 27 (1-2), 221-230.
- Thomas MJ, Malenka RC, Bonci A. (2000). Modulation of long-term depression by dopamine in the mesolimbic system. *The Journal of Neuroscience*, 20 (15), 5581–5586.
- Thompson BL, Levitt P, Stanw GD. (2009). Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nature reviews Neuroscience*, 10, 303-312.
- Tindell AJ, Berridge KC, Aldridge JW. (2004). Ventral Pallidal Representation of Pavlovian Cues and Reward: Population and Rate Codes. *The Journal of Neuroscience*, 24 (5), 1058–1069.
- Tindell AJ, Smith KS, Peciña S, Berridge KC, Aldridge JW. (2006). Ventral Pallidum Firing Codes Hedonic Reward: When a Bad Taste Turns Good. *Journal of Neurophysiology*, 96 (5), 2399-2409.

- Tobler I, Kopp C, Deboer T, Rudolph U. (2001). Diazepam-induced changes in sleep: Role of the  $\alpha 1$  GABA<sub>A</sub> receptor subtype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (11), 6464–6469.
- Todtenkopf MS, Parsegian A, Naydenov A, Neve RL, Konradi C, Carlezon Jr WA. (2006). Brain Reward Regulated by AMPA Receptor Subunits in Nucleus Accumbens Shell. *The Journal of Neuroscience*, 26 (45), 11665–11669.
- Tzschentke TM. (1998). Measuring Reward With The Cconditioned Place Preference Paradigm: A Comprehensive Review Of Drug Effects, Recent Progress And New Issues. *Progress in Neurobiology*, 56 (6), 613-672.
- Tzschentke TM. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology*, 12 (3-4), 227-462.
- Uusi-Oukari M, Korpi ER. (2010). Regulation of GABA<sub>A</sub> Receptor Subunit Expression by Pharmacological Agents. *Pharmacological Reviews*, 62 (1), 97–135.
- Uzun S, Kozumplik O, Jakovljević M, Sedić B. (2010) Side effects of treatment with benzodiazepines. *Psychiatria Danubina*, 22 (1), 90-3.
- Verney C. (2003). Phenotypic expression of monoamines and GABA in the early development of human telencephalon, transient or not transient. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 26 (4), 283-292.
- Wala EP, Sloan JW, Jing X, Holtman JR Jr (1999) Precipitated withdrawal in the substantia nigra in diazepam-dependent female rats. *Pharmacology and Biochemistry Behavior* 64(4), 857-68.
- Wang Y-C, Huang AC, Hsiao S. (2010). Paradoxical simultaneous occurrence of amphetamine-induced conditioned taste aversion and conditioned place preference with the same single drug injection: A new “pre- and post-association” experimental paradigm. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 95, 80–87.
- Wee S, Koob GF. (2010). The role of the dynorphin– $\kappa$  opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berlin)*, 210 (2), 121–135.
- Wheeler RA, Twining RC, Jones JL, Slater JM, Grigson PS, Carelli RM. (2008). Behavioral and Electrophysiological Indices of Negative Affect Predict Cocaine Self-Administration. *Neuron*, 57, 774–785.
- Wilcoxon JS, Kuo AG, Disterhoft JF, Redei EE. (2005). Behavioral deficits associated with fetal alcohol exposure are reversed by prenatal thyroid hormone treatment: a role for maternal thyroid hormone deficiency in FAE. *Molecular Psychiatry* 10, 961–971.
- Xia Y, Driscoll JR, Wilbrecht L, Margolis EB, Fields HL, Hjelmstad GO. (2011). Nucleus accumbens medium spiny neurons target non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience*, 31 (21), 7811–7816.

- Xianga K, Tietza EI. (2007). Benzodiazepine-induced hippocampal CA1 neuron AMPA receptor plasticity linked to severity of withdrawal anxiety: differential role of voltage-gated calcium channels and NMDA receptors. *Behavioural Pharmacology*, 18 (5-6), 447-460.
- Zarrindast M-R, Massoudi R, Sepehri H, Rezayof A. (2006). Involvement of GABA<sub>B</sub> receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *Physiology & Behavior*, 87, 31–38.
- Zhang X, Sliwowska JH, (2005). Weinberg J. Prenatal alcohol exposure and fetal programming: effects on neuroendocrine and immune function. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)* 230, 376–388.
- Zheng P. (2009). Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology*, 89, 134–152.