



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Psicología

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**“LA PROGESTERONA Y EL DL-di-CF₃ HEPP
REDUCEN LA HIPEREXCITABILIDAD NEURONAL
DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A GABA (SAG)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

MARYSOL SEGOVIA OROPEZA

DIRECTOR:

DR. EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

REVISOR:

DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO

MÉXICO, D.F., 2014





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.



Esta tesis fue realizada en el Departamento de Neurobiología de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

Tesis apoyada por la Dirección de Investigaciones en Neurociencias
INPRF

(Proyectos: NC093510.1, NC093510.2 y NC093510.3)



Tesis apoyada por el CONACyT

(Proyecto: 166823)

GRACIAS

Dedico esta tesis a mis padres, gracias por su inagotable confianza y apoyo.

Agradezco no tener espacio suficiente para mencionar a todas las personas que quiero, sería como intentar recordar todas las sonrisas que me han obsequiado.

Gracias a todos.

“Los cuentos de hadas superan la realidad no porque nos digan que los dragones existen, sino porque nos dicen que pueden ser vencidos”

-Neil Gaiman

Índice

Lista de abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Introducción.....	9
I. Antecedentes	
1. Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central.....	9
1.1. Ácido γ - aminobutírico	9
1.2. Síntesis y metabolismo del GABA	10
1.3. Recaptura del GABA	12
1.4. El receptor GABA _A	13
1.5. El receptor GABA _B	16
1.6. Fisiología del sistema GABAérgico.....	17
1.7. Moduladores del Receptor GABA _A	18
1.8. Alteraciones del Sistema GABAérgico.....	20
2. Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG).....	21
3. Neuroesteroides.....	29
4. Ansiedad.....	34
II. Justificación.....	37

III. Objetivos	38
Variables de trabajo	38
Hipótesis	39
IV. Material y Método	40
Sujetos.....	40
Sustancias utilizadas en este estudio.....	41
Cirugía estereotáxica.....	42
Registro de la actividad electroencefalográfica (EEG)	43
Inducción del Síndrome de Abstinencia a GABA	44
Prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC)	44
Análisis de Datos	45
Procedimiento experimental	46
V. Resultados	56
VI. Discusión	89
VII. Conclusiones	104
VIII. Referencias	105

Lista de Abreviaturas

α - KG	α - cetogluturato
2-DG	2-desoxiglucosa
AloP	Alopregnanolona
AMPA	Ácido Alfa-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazolpropiónico
BA	Brazos Abiertos
BC	Brazos Cerrados
Bz	Benzodiazepinas
Ca ²⁺	Ión calcio
_{CF₃} HEPP	DL-di-CF ₃ HEPP
Cl ⁻	Ión cloro
CxS	Corteza somatomotora
DHEA	Dihidro Epiandrosterona
Dz	Diazepam
E.E.	Error Estándar
EEG	Electroencefalograma
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor ionotrópico a GABA
GABA _B	Receptor metabotrópico GABA
GABA-T	GABA <i>transaminasa</i>
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GAT	Transportadores de GABA
Glu	Glutamato
h	Hora
HEPP	DI-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida
Hz	Hertzio (ciclo por segundo)
IPSP	Potencial Post-sináptico Inhibitorio
IPSP	Potenciales Post-sinápticos Inhibitorios
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Kilogramos
LEC	Laberinto Elevado en Cruz

MBR	Receptor Mitocondrial de Benzodiazepinas
ml	Mililitros
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
NMDA	Receptores de N-metil-D-aspartato
µg	Microgramos
OVX	Ovarectomizadas
P	Progesterona
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Fosfato de Piridoxal (vitamina B ₆)
PregS	Sulfato de Pregnenolona
Proteínas G	Proteínas de asociadas a nucleótidos de guanina
PTZ	Pentilenetetrazol
SAG	Síndrome de Abstinencia a GABA
s.c.	Subcutáneo
StaR	Proteína de Regulación Aguda de la Estereidogénesis
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SSA	Semialdehído Succínico
SSADH	Succinato Semialdehido Deshidrogenasa
TCA	Ciclo del Ácido Tricarboxílico
5α-R	5α-reductasa
3-HSOR	3-hidroxiesteroide Oxidoreductasa

Resumen

El Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG) es un modelo experimental con actividad epileptiforme inducido por el retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA y que genera un perfil tipo ansioso en las ratas. Datos previos cuantificaron que la alopregnanolona es capaz de inhibir la hiperexcitabilidad generada por el retiro abrupto de la administración de GABA en rebanadas de cerebro; en estudios *in vivo*, sólo el fármaco HEPP logró disminuir el SAG.

Con el objetivo de disminuir el SAG, se aplicó un tratamiento con progesterona, HEPP o CF_3 HEPP a ratas macho de la cepa Wistar. La administración de un tratamiento crónico de progesterona disminuye la hiperexcitabilidad del SAG, cuantificado por la disminución de la potencia y número de complejos espigonda del EEG del hemisferio instilado y contralateral. La administración aguda de progesterona induce una evolución irregular en el EEG del SAG en el hemisferio instilado y disminuye la propagación de la hiperexcitabilidad. Se encontró que el CF_3 HEPP es el fármaco más potente de los utilizados en esta tesis, para disminuir la actividad epileptiforme de la abstinencia a GABA.

Los resultados indican que la hiperexcitabilidad neuronal del SAG se puede disminuir mediante la administración de fármacos moduladores del receptor $GABA_A$, sin embargo, el perfil ansioso inducido por la abstinencia no se modifica.

Introducción

La presente tesis tiene como objeto disminuir la hiperexcitabilidad de un modelo de actividad epileptiforme resistente a anticonvulsivos, el cual se genera mediante el retiro abrupto de la instilación intracortical de ácido γ -aminobutírico (GABA). Este fenómeno ocurre por cambios consecutivos y dinámicos en la pre y postsinápsis, por lo que los antecedentes se desarrollan para describir al sistema GABAérgico, su fisiología, receptores y farmacología, continuando con una descripción del Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG), neuroesteroides y antecedentes inmediatos en el campo de las neurociencias que involucran al SAG, a los moduladores del receptor GABA_A y la ansiedad.

I. Antecedentes

1. Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central

1.1 Ácido γ -aminobutírico

La mayoría de las sinapsis inhibitorias en el cerebro utilizan como neurotransmisor el ácido γ -aminobutírico, el cual es el mensajero químico de tipo inhibitor más abundante en el sistema nervioso central (SNC; Cortes-Romero *et al.*, 2011). Al igual que el glutamato, el GABA fue identificado en tejido cerebral durante los

50s, los detalles de su síntesis y degradación fueron descritos poco después por Ernst Florey y Eugene Roberts.

La primera evidencia de que el GABA actuaba como un transmisor inhibitorio se encontró estudiando las propiedades de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP). Krnjeviè y Schwartz (1967) encontraron que la acción del GABA era hiperpolarizar a la neurona postsináptica, teniendo como consecuencia la disminución de la probabilidad de que una neurona genere un potencial de acción; esta inhibición se da gracias a que el GABA al unirse con su receptor ionotrópico GABA_A, aumenta la corriente entrante de Cl⁻ y el interior de la célula se vuelve más negativo, disminuyendo así la excitabilidad y la probabilidad de generar un potencial de acción (Carlson, 2006). Actualmente se sabe que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio (Mendu *et al.*, 2012) del SNC de los mamíferos y que es utilizado en casi un tercio de las sinapsis del cerebro (Purves *et al.*, 2006).

1.2 Síntesis y metabolismo del GABA

El precursor predominante para la síntesis del GABA es la glutamina, la cual es metabolizada a ácido glutámico (glutamato). La ruta de metabolización del glutamato es la glucólisis citoplásmica seguida del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en la mitocondria. En esta vía, el α -cetoglutarato, el cual es un intermediario en el ciclo del TCA y un importante precursor del glutamato, es generado (Fig. 1).

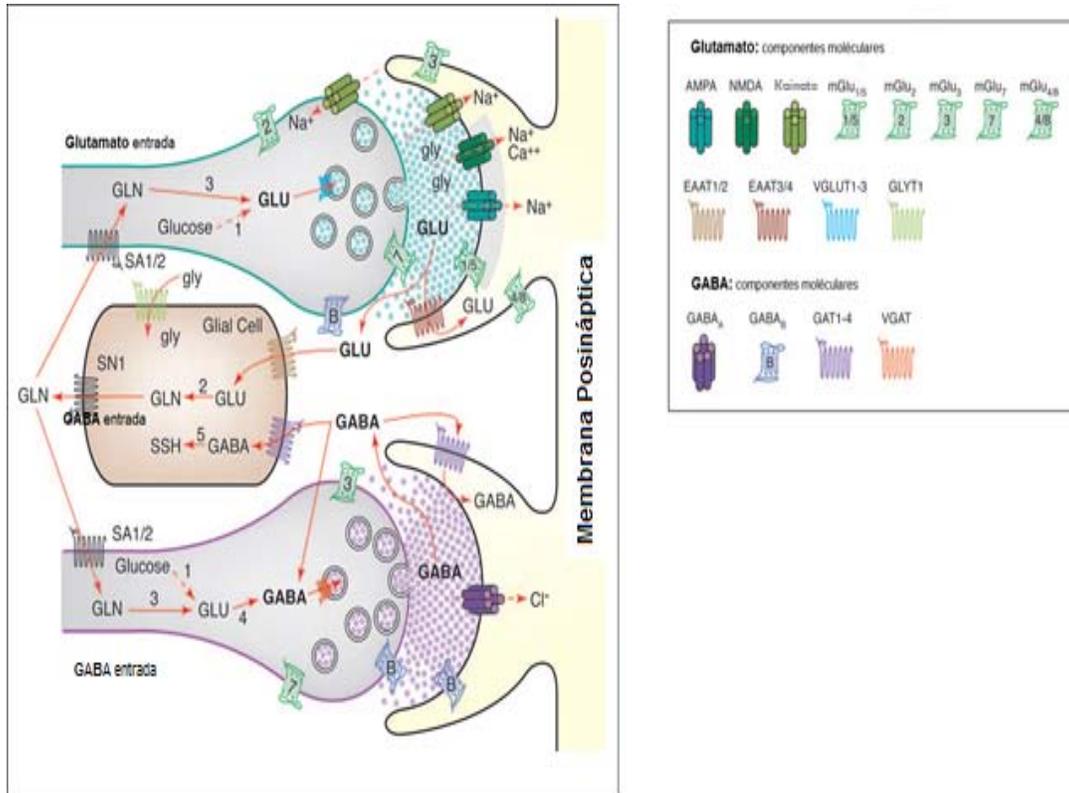


Figura 1. Diagrama de los componentes de los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y glutamatergico. Las vías metabólicas o enzimas están indicadas con los siguientes números: 1. Glucólisis/ ciclo de Krebs; 2. Glutamina sintetasa; 3. Glutaminasa; 4. Glutamato descarboxilasa (GAD); 5. Succinato deshidrogenasa. En el gráfico superior (sinapsis de Glutamato; Glu) se hace referencia a los recaptadores de Glu (2 y 7) así como los receptores ionotrópicos (que permiten el ingreso de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, en el componente postsináptico) y metabotrópicos (1,5 y 4,6). En la parte inferior del panel izquierdo, se observa el papel de metabólico de la glía e inferior a ella, una sinapsis GABAérgica, identificando los transportadores de glutamina (GLN-SA1/2), los receptores GABA_B (B) y el receptor GABA_A que permite el ingreso de Cl^- al componente postsináptico. A la derecha se muestran los iconos utilizados que hacen referencia a los diferentes tipos de receptores para estos neurotransmisores (Imagen modificada de Foster *et al.*, 2006).

Posteriormente, el glutamato que fue generado del α - cetoglutarato se descarboxila por una reacción catalizada por la GAD (ácido glutámico descarboxilasa), la cual es la enzima paso limitante de la síntesis del GABA que requiere del fosfato de piridoxal (PLP) para activarse. Una vez que el GABA es sintetizado, es transportado a las vesículas sinápticas mediante un transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (Hertz, 2013).

La reacción de glutamato a GABA es reversible. El catabolismo del GABA es catalizado por la GABA transaminasa (GABA-T), lo que produce semialdehído succínico (SSA) el cual a través de una conversión estequiométrica del α -cetoglutarato pasa a glutamato. El SSA se oxida rápidamente por la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH), y entra al ciclo de TCA como succinato, por lo tanto, las enzimas que se encuentran en la mitocondria: GABA-T y SSADH, catalizan al GABA.

1.3 Recaptura del GABA

El sistema de recaptura tiene como función principal remover el GABA del espacio sináptico para la inactivación de su efecto. Tanto las neuronas como la glía contienen transportadores de alta afinidad para el GABA denominados GAT, los cuales son proteínas de doce pasos transmembranales cuya activación depende del gradiente electroquímico del Na^+ , por lo que es dependiente de la ATPasa Na^+/K^+ (Olsen, 2000).

Se han identificado 4 tipos de transportadores (GAT 1-4). Los transportadores GAT 1 y 4 son los más abundantes en el SNC de los mamíferos, localizados principalmente en las terminaciones nerviosas. El tipo GAT-2 es abundante en la glía y el GAT-3 está altamente expresado en las leptomeninges y en el plexo coroideo. Tiene sitios para ser fosforilado: uno para proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) y siete para proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), por lo que el proceso de recaptura es modulado por la actividad de segundos mensajeros (Bowery, 1990; Nelson *et al*, 1990).

Los efectos del GABA a nivel pre y post-sináptico son consecuencia de su interacción con proteínas que funcionan como receptores. Los receptores a GABA se expresan a través de todo el SNC y son responsables de gran parte de la inhibición tónica y rápida (Sabaliauskas *et al.*, 2012). Los receptores están divididos en dos grandes grupos: el GABA_A que es ionotrópico y el GABA_B el cual es de tipo metabotrópico. Un subtipo del receptor GABA_A es el denominado GABA_C, el cual está localizado principalmente en la retina.

1.4 El receptor GABA_A

El receptor ionotrópico GABA_A es un heteropentámero membranal cuyas subunidades al ensamblarse forman un canal que permite el paso de iones de Cl⁻ o HCO₃⁻ (Fig. 2; Cortes-Romero *et al.*, 2011). Hasta la fecha se conocen 19 diferentes subunidades (α1-6,

$\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , π , θ , $\rho 1-3$) cuyas combinaciones determinan la ubicación en la membrana (Whiting, 2003), especificidad farmacológica y cinética del receptor (Mendu *et al.*, 2012), siendo la subunidad β el sitio de reconocimiento para el agonista.

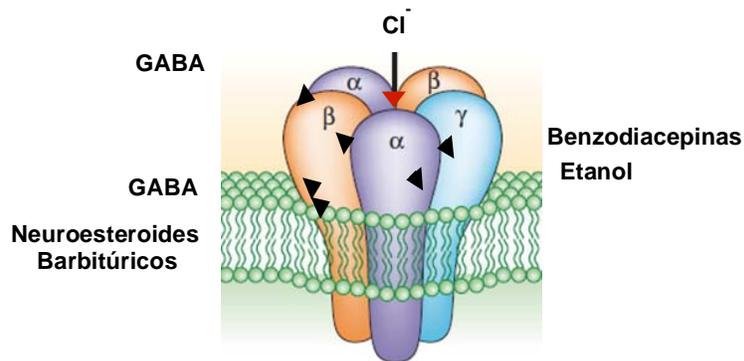


Figura 2. Esquema del receptor GABA_A. Es un heteropentámero que en su forma más común contiene dos subunidades α , dos β y una γ o δ . Cada subunidad está compuesta de 4 hélices transmembranales (M1-M4); M2 forma el canal central que permite el paso de iones de Cl⁻ el cual se activa cuando se unen dos moléculas de GABA entre α y β . El receptor tiene sitios de unión para varias moléculas como las benzodiazepinas, el etanol y los neuroesteroides. (Imagen modificada de Belelli y Lambert, 2005).

Cada subunidad consta de un extremo N-terminal extracelular, que forma parte del sitio de unión para agonistas y antagonistas, tres segmentos transmembrana (M1-M3), una asa intracelular y un cuarto dominio transmembrana (M4) con un extremo C-terminal extracelular (Möhler, 2006).

Tabla1. Ubicación de isoformas y distribución del receptor GABA_A

Isoformas GABA _A	Distribución en el SNC
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Capa granular del bulbo olfatorio, capa de células polimorfas y región CA3 del hipocampo, interneuronas corticales, globo pálido y varios núcleos subtalámicos.
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	Bulbo accesorio olfatorio, el estriado, el septum, la capa molecular del giro dentado e hipocampo.
$\alpha_2\beta\gamma_1$	Es posible y se sugiere que se exprese en la glía de Bergmann y en núcleos del sistema límbico.
$\alpha_3\beta\gamma_2$	Células monoaminérgicas de varios núcleos cerebrales.
$\alpha_3\theta\epsilon$	Locus coeruleus de la rata.
$\alpha_4\beta\gamma_2$	Tálamo, caudado, putamen y giro dentado.
$\alpha_4\beta_2\delta$	Núcleos talámicos y la corteza cerebral.
$\alpha_4\beta_3\delta$	Células granulares de giro dentado, la corteza cerebral y predominantemente en el estriado.
$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	Neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.
$\alpha_6\beta\gamma_2$ $\alpha_6\beta_2\delta$ $\alpha_6\beta_3\delta$	Células granulares del cerebelo y el núcleo coclear.

Tabla 1. Isoformas y distribución del receptor GABA_A. En la columna de la izquierda se presentan las subunidades que componen las diferentes isoformas del receptor GABA_A, en la columna de la derecha se muestra su distribución en el SNC (Tabla modificada de Miguel, 2012).

La mayoría de los receptores GABA_A están compuestos por las subunidades $\alpha\beta\gamma$ (en estequiometría 2:2:1 respectivamente). La isoforma más abundante es la $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (Olsen y Sieghart, 2009), la cual se expresa en membranas sinápticas donde existen altas concentraciones de GABA (mM) que son liberadas en pulsos episódicos breves provenientes de terminales de interneuronas locales. Los receptores GABA_A también se expresan en sitios extrasinápticos como en el soma y las dendritas de la neurona, donde la inhibición es tónica y contribuye más al tono inhibitorio que las corrientes fásicas de los receptores sinápticos (Smith, 2012).

Los receptores que contienen subunidades γ_2 se expresan en las membranas sinápticas y extrasinápticas, éstos controlan la inhibición sináptica y tónica; los isómeros con la subunidad δ son exclusivamente extrasinápticos y modulan sólo la inhibición tónica (Wei *et al.*, 2003; Farrat y Nusser, 2005); las isoformas que se expresan dependen de la zona del cerebro (Tabla 1).

1.5 El receptor GABA_B

La segunda principal categoría de los receptores GABA son los metabotrópicos de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, conocidos como GABA_B. Se considera metabotrópico por que tiene una acción lenta y prolongada. Se encuentra principalmente en la membrana presináptica y postsináptica donde actúa como autoreceptor, inhibiendo la liberación de GABA; puede jugar el mismo papel en neuronas que liberan otros neurotransmisores (heteroreceptores). Este receptor está asociado

con canales iónicos sensibles de Ca^{2+} o K^+ involucrando la activación de segundos mensajeros (Enna y Möhler; 2007).

Los receptores GABA_B se componen de la subunidad GABA_{B1} y GABA_{B2} , a nivel postsináptico estos receptores se expresan en neuronas GABAérgicas o no GABAérgicas, restableciendo el potencial de membrana en reposo, y debido a la diferencia en la estructura de este receptor con el receptor ionotrópico GABA_A , no es capaz de reconocer a la bicuculina ni a la isoguvacina, en caso contrario, es activado por el baclofén (Kaupmann *et al.*, 1998; Enna, 2001)

En las células piramidales del hipocampo, la activación del receptor GABA_B incrementa la conductancia de K^+ sin afectar la conductancia de Ca^{2+} . Este hallazgo indica que los receptores y los canales dependientes de K^+ y de Ca^{2+} son distintos en la periferia y el SNC (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988).

1.6 Fisiología del sistema GABAérgico

El GABA se considera como un neurotransmisor inhibitorio en el cerebro de vertebrados, lo cual se basa en la observación de que en la mayoría de los casos el potencial eléctrico del Cl^- en las neuronas, es menor que el del ambiente extracelular, el cual es de 10 a 20 veces mayor (150 mM). Al unirse el GABA al receptor, se abre el canal de Cl^- asociado y permite una corriente de Cl^- a la neurona, hiperpolarizando la membrana neuronal y haciendo a la neurona menos reactiva a neurotransmisores excitatorios (Carlson, 2006).

El efecto a nivel presináptico se observa mediante la activación del receptor GABA_B y una subsecuente disminución de la entrada de Ca²⁺ al botón terminal, generando así una disminución de liberación de neurotransmisores (Bettler *et al.*, 2004). En algunas neuronas se fortalece la inhibición con el incremento de la conductancia lenta de K⁺; este evento es conocido como potencial postsináptico inhibitorio (IPSP), los cuales pueden ser rápidos (menos de 100 ms) o lentos (más de 100 ms; Bowery *et al.*, 2002).

1.7 Moduladores del receptor GABA_A

¿Por qué existen tantos subtipos de receptores GABA_A? La heterogeneidad de los receptores GABA_A permite la flexibilidad en la transducción de señales y la modulación alostérica (Rey *et al.*, 2013). El receptor GABA_A tiene sitios de unión para varias drogas de uso clínico, incluyendo las benzodiazepinas (Bz), barbitúricos y neuroesteroides (NE). Estos sitios de unión se forman por las distintas combinaciones de las subunidades (Akk *et al.*, 2005; Veleiro y Burton, 2009).

Las Bz, como el diazepam, son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, lo que significa que se unen al receptor en un sitio distinto al GABA y facilitan la transmisión GABAérgica inhibitoria del receptor GABA_A. El sitio de unión de las Bz se encuentra entre las subunidades α_1 y γ_2 ; ambas subunidades se requieren para que aumente la frecuencia de la apertura del canal permitiendo una corriente entrante de Cl⁻ (Cortes-Romero *et al.*, 2011).

Las sinapsis GABAérgicas son el blanco farmacológico de los barbitúricos, y en ellas subyacen los mecanismos moleculares de su tolerancia y dependencia. Los barbitúricos son fármacos depresores del SNC, con propiedades sedativas, hipnóticas y anestésicas. El pentobarbital, por ejemplo incrementa la respuesta a GABA, prolongando la duración de apertura de los canales de Cl⁻ sin afectar su frecuencia de apertura. Estudios electrofisiológicos revelaron que los anestésicos tienen por lo menos tres mecanismos de acción distintos: 1) potenciación de la respuesta a GABA (Lin *et al.*, 1992), 2) activación directa de los receptores GABA_A (Franks y Lieb; 1994) y 3) en altas concentraciones, un bloqueo del canal de Cl⁻ (Brandon y Fischer; 2006).

Los esteroides tienen sitios de acción distintos a los de las Bz y barbitúricos, asimismo, pueden abrir de manera directa el canal de Cl⁻ asociado al receptor GABA_A e incrementar la frecuencia y duración de apertura del poro (Sieghart, 1995).

Mientras que los agonistas como el muscimol y la isoguvacina son capaces de unirse al mismo sitio en el que el GABA induce sus respuestas inhibitorias, los antagonistas como la picrotoxina, pentilinetetrazol (PTZ), penicilina y la bicuculina, bloquean el poro del canal de Cl⁻ acoplado a los receptores GABA_A, generando convulsiones (Cortes-Romero *et al.*, 2011).

1.8 Alteraciones del sistema GABAérgico

Los desórdenes psiquiátricos están asociados a un desequilibrio entre la excitación y la inhibición neuronal y se ha demostrado que patologías como la epilepsia, ansiedad y la depresión pueden ser causadas por la alteración de este equilibrio (Foster y Kemp, 2006).

Estudios *in vivo* demostraron que diversas drogas que se sabe generan convulsiones en animales experimentales y humanos, como la penicilina, el PTZ, la picrotoxina y la bicuculina son antagonistas GABAérgicos (Gale, 1992; Gloor *et al.*, 1967; Klitgaard *et al.*, 1998). Por otra parte, las drogas que potencian la inhibición GABAérgica, como el diazepam (Choi *et al.*, 1977, 1981; Macdonald Y Berker, 1978) y el pentobarbital (MacDonald y Barker, 1979) tienen efectos anticonvulsivos. Estas observaciones sugirieron que la actividad GABAérgica comprometida podría llevar al desarrollo de la epilepsia.

El desajuste o fallo en la transmisión GABAérgica genera hiperexcitabilidad, lo que a su vez desencadena el fenómeno epileptogénico (Olsen, 2000). La fisiopatología de la epilepsia tiene un fuerte determinante genético, puesto que mutaciones puntuales, o bien deleciones cromosómicas, capaces de alterar la expresión neuronal de alguna proteína membranal o una determinada subunidad para un canal iónico, provocan anomalías funcionales del paso selectivo de un ion y en consecuencia, alteraciones de la excitabilidad neuronal (Cabo de la Vega *et al.*, 2006).

Hoy sabemos que la expresión, tráfico y ensamblaje de las subunidades que componen los receptores sinápticos GABA están alteradas en animales epilépticos (Joshi *et al.*, 2013).

La disminución en la sensibilidad de los receptores GABA a los neuroesteroides es una alteración fisiológica importante asociada con la epilepsia (Joshi *et al.*, 2013). Estudios inmunohistoquímicos revelaron una mayor expresión de las subunidades α_4 y γ_2 , principalmente en la capa molecular de las células granulares del giro dentado de animales epilépticos (Peng *et al.*, 2004).

Hoy en día se sabe que el fallo en una correcta expresión de la subunidad γ_2 del receptor GABA_A es la disrupción estructural que da origen a la epilepsia (Cabo de la Vega *et al.*, 2006; Baulac *et al.*, 2001). Muchos de los cuadros idiopáticos se explican por la alteración de genes que codifican subunidades de canales de Cl⁻, incluidas las alteraciones del receptor GABA (Joshi *et al.*, 2013).

2. El Síndrome de Abstinencia a GABA

En el transcurso de la investigación sobre la relación entre el GABA y la epilepsia, se demostró un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo a la interrupción del tratamiento con GABA en el mandril fotosensible *Papio papio* (Brailowsky, 1991; Brailowsky *et al.*, 1989). En estos monos, la estimulación luminosa intermitente inducía la aparición de descargas epilépticas a nivel de la corteza cerebral acompañadas de mioclonías generalizadas. La infusión directa de GABA en la corteza a través de cánulas intracorticales fue capaz de generar un efecto anticonvulsivo. Al día siguiente de haber cesado la

instilación intracortical de GABA, en todos los monos se constató la presencia de focos de actividad paroxística. Independientemente del área de infusión, el electrodo de registro mostró la aparición de poliespigas y actividad en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora, se correlacionaba con la aparición de mioclonías (Brailowsky *et al.*, 1988).

Posteriormente se confirmó la presencia del fenómeno de hiperexcitabilidad en la rata epiléptica (kindling amigdalino) y en la rata no epiléptica (Brailowsky *et al.*, 1987). El fenómeno se caracterizó conductual y electroencefalográficamente (Brailowsky *et al.*, 1988). A este fenómeno de hiperexcitabilidad cortical generado por la interrupción de la instilación intracortical de GABA se le llamó “Síndrome de abstinencia al GABA” (SAG; Silva-Barrat *et al.*, 1992).

Además de las crisis convulsivas, los animales mostraban otros signos clínicos tales como mioclonus de la pata posterior contralateral al hemisferio instilado, movimiento incesante de las vibrisas, irritabilidad y aumento de la conducta exploratoria. Se presentaron datos de dependencia física ya que la re-infusión de GABA hizo que desaparecieran las manifestaciones EEG. También existen datos de tolerancia cruzada a Bz (diazepam; Dz) y a barbitúricos (pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modificaban la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica en las primeras 24 h (Brailowsky *et al.*, 1992).

Mediante la técnica de la captura/metabolismo de la 2-desoxiglucosa radioactiva, se cuantificó un aumento significativo (tres a cinco veces en relación al control) en el consumo local de glucosa del área cortical involucrada en la generación de actividad paroxística y también en la zona talámica ipsilateral de proyección: núcleos posterior oralis, ventro-posterolateral, central-lateral, ventro-lateral y reticular; en cerebros de ratas obtenidos 60 min. después del retiro abrupto del GABA. Estas regiones con incremento de la actividad metabólica oxidativa corresponden con las áreas de gliosis-reactiva identificadas en los cerebros de animales obtenidos 10 días después de haberse interrumpido la actividad paroxística (Menini *et al.*, 1991).

En investigaciones subsecuentes, se encontró que posterior a las infusiones crónicas intracorticales de GABA, la actividad de la GAD disminuyó en un 40% a nivel del sitio de infusión del aminoácido (Salazar *et al.*, 1994).

Experimentos enfocados a determinar el papel de los receptores GABA_A y GABA_B en el SAG, indicaron que es un fenómeno dependiente del primero. La evidencia que apoya esta afirmación es farmacológica: por una parte, es posible inducir un foco epiléptico al interrumpir infusiones localizadas de isoguvacina, un agonista GABA_A específico, y por la otra, la constatación de que los agonistas específicos del receptor GABA_B como el baclofén inducen el foco epiléptico durante su instilación y no cuando estos se retiran (Brailowsky *et al.*, 1990, Brailowsky, 1991).

El incremento de la excitabilidad neuronal de este modelo es la consecuencia de cambios dinámicos y consecutivos en los componentes presinápticos y postsinápticos. En la presinapsis existe una reducción en la síntesis y liberación de GABA por la disminución en la expresión y actividad de la GAD, lo que incide en la disminución de la liberación y la concentración de GABA en el espacio sináptico. En el componente postsináptico hay una disminución en la densidad de receptores GABA_A y de forma gradual, los nuevos receptores GABA_A presentan una menor sensibilidad farmacológica debido a cambios en la expresión de las subunidades que lo conforman. Finalmente el fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal se ve favorecido por un incremento en la entrada de Ca²⁺ a la célula (Calixto, 2012).

En rebanadas de cerebro se identifica por el incremento en la sincronización de disparo de neuronas piramidales y por cambios en las propiedades activas de la membrana neuronal (Calixto, 2012). A nivel molecular se ha observado que la presencia continua de una elevada concentración de GABA puede producir una *down regulation* de los receptores GABA_A en las neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo (Calixto *et al.*, 2000).

La fenomenología de la inducción del SAG indica que primero son los cambios en la neurotransmisión GABAérgica y posteriormente se instalan modificaciones de otras neurotransmisiones, es decir que la actividad epileptiforme observada en el EEG, posterior al retiro abrupto de la instilación

intracortical de GABA, depende de una modificación sináptica que se inicia por la disminución del tono GABAérgico. Posteriormente se agrega el incremento de la actividad de los receptores a glutamato (NMDA y AMPA), asociado al aumento del tono colinérgico y adrenérgico. Sin embargo, no se presentan modificaciones en la actividad serotoninérgica, ni cambios en la sensibilidad de algunos canales iónicos sensibles a voltaje como los canales de Ca^{2+} tipo L (Katsura *et al.*, 2007).

Si bien los sucesos sináptico-moleculares son difíciles de identificar, nuestra línea de investigación demuestra que las primeras 24 hrs del SAG dependen exclusivamente de los cambios excitatorios en la neurotransmisión GABAérgica (Araneda *et al.*, 1994).

Datos previos de nuestra línea de investigación indican que el SAG inducido con $6\mu l$ a una concentración de 5mM durante 2 horas ($3\mu l/h$) genera un aumento de potencia (182%) en ambas cortezas cerebrales el día de inducción, a comparación del registro control. El aumento de potencia se registró en la banda de frecuencia de 5 a 15 Hz (Pimentel, 2013).

Al realizar el Análisis del Espectro de Frecuencia de Wavelets se encontró que la hiperexcitabilidad en la rata macho tiene una duración de 9-10 días y se presentan 0.9 espigas/seg (Pimentel, 2013). En la rata hembra el aumento de potencia en ambas cortezas cerebrales fue de un 133% durante el día de inducción; la

hiperexcitabilidad neuronal evoluciona progresivamente hasta regresar a niveles basales en el día 6 posterior a la instilación y se presentan 1.1 espigas/seg. En ambos sexos el SAG induce un perfil ansioso en la rata (Hernández, 2013).

En estudios farmacológicos preliminares se encontró que el foco epiléptico del SAG, en sus primeras 24 hrs, es resistente a anticonvulsivos de uso clínico (fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepinas) e incluso al fármaco de elección en casos de status epiléptico: el diazepam. La frecuencia de descarga del foco no se modifica significativamente aún empleando dosis anestésicas de pentobarbital (35 mg/Kg; Brailowsky, 1991).

Ante estas evidencias, en la fase de inicio del SAG nos encontramos con un modelo de hiperexcitabilidad neuronal intratable en el cual es posible ensayar fármacos anticonvulsivos y sedantes.

En la búsqueda de nuevos agentes anticonvulsivos, Carvajal y colaboradores (1964) sintetizaron una serie homóloga de fenil-alquil-amidas con marcada actividad anticonvulsivante, de las cuales el DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP) demostró ser el menos neurotóxico, por lo que se utilizó en diversos modelos de crisis convulsivas; en el modelo con pentilentetrazol (PTZ) en ratas, se encontró una relación directa entre el efecto anticonvulsivante y la concentración de fármaco en el cerebro (Javier *et al.*, 1996).

Del mismo modo, el HEPP mostró un efecto anticonvulsivo en el modelo del SAG, en el que por primera vez se cuantificó una

disminución en la frecuencia de descargas del foco epiléptico producidas por la interrupción abrupta de la instilación intracortical de GABA.

En los animales en los que el HEPP fue administrado 60 min después de iniciado el SAG, la frecuencia de descarga de la actividad paroxística disminuyó significativamente, sin afectar la amplitud de la descarga ni su propagación al lado homólogo contralateral. Ese efecto sin embargo fue parcial y de corta duración, ya que no logró suprimir totalmente las descargas paroxísticas y su actividad sólo se mantuvo durante 90 min (Brailowsky y Montiel, 1996).

Mientras que en experimentos *in vivo* el HEPP logró disminuir de forma paulatina la hiperexcitabilidad del SAG, experimentos *in vitro* de nuestra línea de investigación indican que la aplicación de alopregnanolona (AloP) en rebanas de cerebro, previo a la aplicación y retiro abrupto de GABA, inhibe la hiperexcitabilidad.

En investigaciones previas (Pimentel, 2013) se encontró que aunque la inducción del SAG en ratas gonadectomizadas no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales sexualmente expertos en la banda de frecuencia en la que aparece la hiperexcitabilidad (4-15 Hz), al realizar el análisis cuantitativo de la potencia del EEG se encontró que la gonadectomización incrementa el voltaje de la actividad eléctrica basal con respecto a los animales sexualmente expertos; esto se

debe a que las hormonas sexuales son capaces de modificar el EEG tanto en machos como en hembras (Del Rio-Portillas *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 1995; Juárez y Corsi-Cabrera, 1995).

Durante la inducción y mantenimiento del SAG el incremento en la potencia del EEG en los animales GDX fue 40% mayor tanto en el hemisferio instilado como en el hemisferio contralateral, comparado con el grupo de animales sexualmente expertos (Pimentel, 2013). El análisis espectral muestra claramente que los neuroesteroides tienen influencia en la actividad EEG (Fernández-Guasti *et al.*, 2003; Del Rio-Portilla *et al.*, 1997; Juárez *et al.*, 1995) de esta forma pueden modular la inducción y el mantenimiento de varias entidades farmacológicas y patológicas de la excitabilidad del SNC.

En el modelo del SAG se encontró que se presenta más potencia en animales GDX, lo cual indica la importancia de las concentraciones hormonales de los animales, en especial la presencia de NE y la susceptibilidad de generar hiperexcitabilidad neuronal (Pimentel, 2013).

Algunas investigaciones han propuesto que las hormonas sexuales pueden tener un efecto anticonvulsivo modulando actividad GABAérgica en la epilepsia, demostrando que pueden disminuir las crisis. Por ejemplo, se ha encontrado que pueden tener un efecto protector en neuronas del hipocampo lesionadas con ácido kaínico o por PTZ (Reddy, 2004; Ramsden, *et al.*, 2003; Frye y Reed, 1998;

Frye, 1995; Kubli-Garfias *et al.*, 1982).

3. Neuroesteroides

Los neuroesteroides (NE) son una subclase de esteroides que pueden sintetizarse en el SNC de *novo* a partir del colesterol, independientemente de las fuentes periféricas (ovarios, testículos, glándulas adrenales, placenta, hígado y huesos). En cambio el término esteroide neuroactivo se refiere a esteroides que, independientemente de su origen, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y tener efectos en el cerebro para regular funciones del SNC (Martín-García *et al.*, 2007).

Las principales células estereidogénicas en el sistema nervioso son las neuronas y las células gliales: en el sistema nervioso periférico (SNP) son las células de Schwann, y en el SNC los oligodendrocitos y astrocitos (Tsutsui *et al.*, 2000). Las enzimas responsables de su síntesis se localizan tanto en células gliales como en neuronas localizadas principalmente en regiones como el hipocampo, la corteza, el hipotálamo y el cerebelo.

La biosíntesis de los NE empieza con la conversión enzimática del colesterol a pregnenolona. El paso metabólico limitante en la estereidogénesis es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentra el citocromo P450 *side chain cleavage* (P450_{scc}) que transforma el colesterol en pregnenolona (Martín-García *et al.*, 2007). La pregnenolona es el esteroide precursor que origina a los NE que regulan al sistema

GABAérgico entre los que se encuentran los androstáneos y pregnanos.

Existen dos proteínas que median la traslocación de colesterol citoplasmático a la membrana interna mitocondrial: la proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR, del inglés *steroidogenic acute regulatory protein*) y el receptor mitocondrial de benzodiazepinas (MBR del inglés *mitochondrial-type benzodiazepine receptor*). El receptor MBR forma un poro a través del cual transita el colesterol. La proteína StAR parece interactuar con el receptor MBR para facilitar el transporte de colesterol (Belelli y Lambert, 2005).

Se ha propuesto que la proteína StAR capta el colesterol de la membrana mitocondrial externa y lo transfiere al MBR (Fig. 3) que formaría el canal de colesterol y lo dirigiría a la membrana mitocondrial interna para usarse como sustrato de la enzima P450_{sc} (Martín-García *et al.*, 2007).

El principal mecanismo de acción de los NE en el SNC es la modulación alostérica de receptores ionotrópicos (Rupprecht y Holsboer, 1999). Casi la totalidad de los receptores ionotrópicos conocidos modifican su función por los NE, pero la modulación alostérica de los receptores GABA_A es la que más extensamente se ha estudiado.

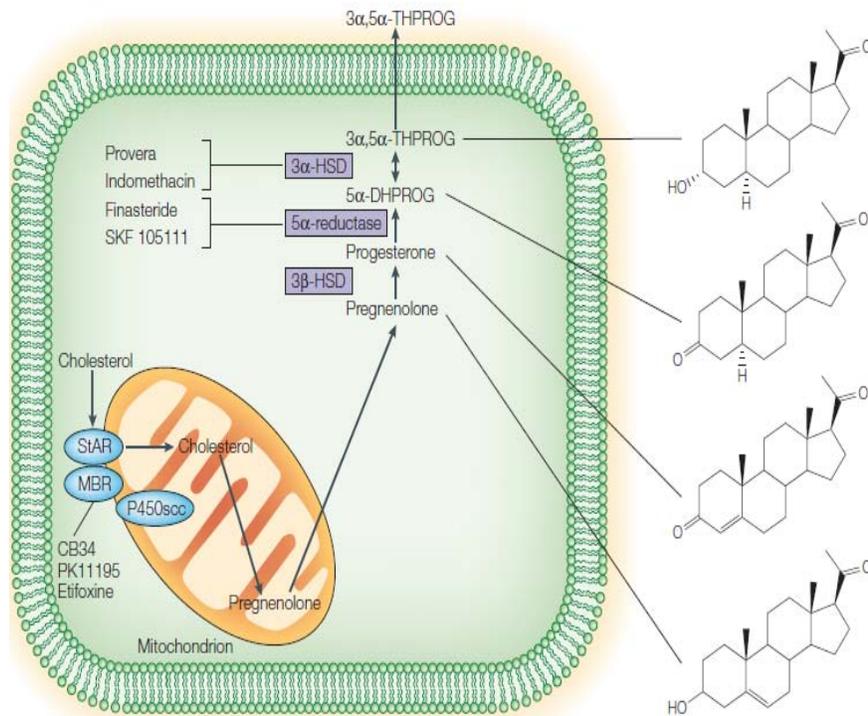


Figura 3. Biosíntesis de los neuroesteroides moduladores del receptor GABA_A. Se muestra la ruta de síntesis de la AloP (3α,5α-HTP) desde el colesterol. La StAR podría interactuar con el receptor periférico de benzodiazepinas (MBR) para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial. P450scc: citocromo P450 side chain cleavage; 3α o 3β-HSD: 3α o 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5α-DHP: 5α-dihidroprogesterona. Imagen modificada de Belelli y Lambert (2005).

Algunos NE, en particular los derivados 3α de la progesterona (P), se comportan como moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA_A. Se ha demostrado que la acción de la AloP es 20 veces más potente que la acción de las Bz y 200 veces más potente que la acción de los barbitúricos sobre la activación de estos receptores (Harrison y Simmonds, 1984).

Estudios electrofisiológicos en neuronas hipocampales confirmaron que los derivados 3α de la P actúan sobre el receptor aumentando la duración de apertura del canal de Cl^- y por otra parte, aumentando su frecuencia de apertura (Lambert *et al.*, 1995).

Otros NE como la dihidroepiandrosterona (DHEA) o el sulfato de pregnenolona (PregS) actúan como moduladores alostéricos negativos del receptor GABA_A , inhibiendo la entrada de Cl^- y reduciendo la frecuencia de apertura del canal de Cl^- sin modificar la duración (Gee, 1988; Mienville y Vicini, 1989).

La P a través de la AloP potencia las corrientes de Cl^- ; este NE tiene sitios de unión específico en el receptor GABA_A que son distintos a los sitios de unión que poseen las Bz, los barbitúricos, el alcohol e incluso del GABA (Lambert *et al.*, 2003). Aunque el mecanismo exacto de cómo los NT interactúan con el receptor ionotrópico no es muy claro, se han identificado sitios de unión transmembranales que regulan la potenciación y directa activación de los efectos (Hosie *et al.*, 2006).

Hoy se sabe que los NE como la Alop pueden realizar dos acciones a través del receptor GABA_A : 1) potenciar las corrientes entrantes de Cl^- en presencia de GABA y 2) activar directamente el receptor GABA_A a concentraciones que van de 2-4 nM (Hosie *et al.*, 2006; Belleli *et al.*, 2002).

Aunque los NE pueden modular los receptores GABA_A sinápticos y extra-sinápticos, su acción moduladora se ve favorecida

por los receptores extrasinápticos con aquellas isoformas que contengan la subunidad δ (Herd *et al.*, 2007).

La exposición crónica de P (o Alop) induce una *down-regulation* de la subunidad γ_2 y una *up-regulation* de la subunidad α_1 , que consecuentemente resulta en alteraciones de la composición de los receptores GABA_A y que impactan directamente en la farmacología del receptor (Foley *et al.*, 2003). En cambio, la abstinencia a P, induce hiperexcitabilidad neuronal y *up-regulation* de la subunidad α_4 (Gulinello *et al.*, 2003; Gulinello *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2007).

Se ha sugerido que el incremento en la susceptibilidad de inducir crisis convulsivas durante la abstinencia a P se debe a cambios en las propiedades biofísicas del receptor GABA_A: el incremento de la subunidad α_4 (Hsu y Smith, 2003; Smith *et al.*, 2007).

La subunidad α_4 : 1) es insensible farmacológicamente a las Bz, 2) es capaz de coensamblarse con las subunidades γ_2 o δ y 3) puede acelerar la desensibilización de las corrientes de Cl⁻ (Sur *et al.*, 1999). Así, el incremento en la expresión de la subunidad α_4 reduce la inhibición mediada por los receptores GABA_A y promueve el aumento en la susceptibilidad de inducir crisis convulsivas e hiperexcitabilidad neuronal.

Datos previos de nuestra línea de investigación señalan que la interrupción abrupta de la administración crónica de P (7 días, 45mg/Kg; s.c.) induce hiperexcitabilidad neuronal; posterior a la

última administración de P, el análisis electroencefalográfico de Wavelets identificó que la potencia del EEG tiene un incremento significativo en la banda de frecuencia de 4-20 Hz. En el día de inducción, la corteza somatomotora derecha muestra un aumento del 226% en la potencia total del EEG, comparado a su registro control. La amplitud disminuyó discretamente durante los siguientes 4 días (Mejía, 2013).

El registro de la actividad electrofisiológica a partir de la última dosis de P, permitió cuantificar el número de complejos espiga-onda que se presentaron durante la abstinencia. Se identificó un aumento del 687% comparado al registro control; durante los días 3 y 4 de la abstinencia se registró la máxima excitabilidad cortical (Mejía, 2013).

4. Ansiedad

Los trastornos de ansiedad tienen una alta prevalencia, y están en las primeras causas de atención médica (Weiller *et al.*, 1998). Clínicamente se sabe que la ansiedad es la manifestación de la conducta de miedo la cual se caracteriza por un estado de alerta continua ante el peligro (Möhler, 2012). Este es un proceso común en la vida adulta del ser humano. La ansiedad es uno de los componentes de muchos síndromes y patologías relacionados a cambios en la neurotransmisión GABAérgica, glutamatérgica, serotoninérgica y noradrenérgica (Martín-García *et al.*, 2007; Czlonkowska *et al.*, 2003; Clement y Chapouthier, 1997).

La farmacología del sistema GABAérgico sostiene la perspectiva de que las disfunciones GABAérgicas están relacionadas

causalmente con los síntomas ansiosos. Por ejemplo, el PTZ actúa bloqueando el receptor GABA_A y genera ansiedad y conductas de evitación cuando se utiliza en la clínica (Kalueff y Nutt, 1997). De manera contraria, aumentar la transmisión GABAérgica usando por ejemplo Bz, es un mecanismo poderoso para inhibir los trastornos ansiosos.

Estudios clínicos y animales indican que disfunciones pre y postsinápticas en la transmisión GABAérgica pueden ser la causa de trastornos ansiosos y del estado de ánimo (Luscher *et al.*, 2011; Smith y Rudolph, 2012; Möhler, 2012).

Investigaciones con espectroscopía de resonancia magnética cuantificaron niveles corticales disminuidos de GABA en pacientes con trastorno de pánico (Goddard *et al.*, 2001). Se ha reportado que una disminución localizada en la unión de Bz en el lóbulo temporal se presenta en pacientes con trastornos de ansiedad generalizada (Tiihonen *et al.*, 1997). Estos resultados son consistentes con la visión de que al menos algunos trastornos de ansiedad están relacionados con procesos inhibitorios GABAérgicos defectuosos (Nutt y Malizia, 2001).

La subunidad γ_2 del receptor GABA_A es de particular interés ya que estudios señalan que esta subunidad regula las acciones de las Bz (Pritchett *et al.*, 1989; Gunther *et al.*, 1995). Ratones que son heterocigotos para el gen de la subunidad γ_2 muestran conductas ansiosas y depresivas (Crestani *et al.*, 1999).

Alteraciones del receptor GABA_A se consideran como una predisposición para trastornos de ansiedad en humanos. Los síntomas ansiosos son una manifestación de una neurotransmisión GABAérgica alterada (Nutt y Malizia, 2001; Crestani *et al.*, 1999; Möhler, 2002).

Los moduladores del receptor GABA_A también pueden afectar la respuesta al estrés. La administración sistémica de AloP, provoca efectos sedativos, hipnóticos anticonvulsivantes y ansiolíticos (Lambert *et al.*, 1995), en cambio el PregS, modulador negativo del receptor GABA_A y positivo del NMDA, presenta un perfil ansiogénico en el laberinto elevado en cruz (LEC; Melchior y Ritzmann, 1994).

Diversos estudios en ratas han demostrado que la ansiedad se reduce tras la aplicación de fármacos como las Bz, agonistas del receptor GABA_A (Rodgers y Dalvi, 1997). Esto cuantificado por el aumento en el número de entradas o tiempo de permanencia en los brazos abiertos (BA) de un laberinto elevado en forma de cruz, que funciona como paradigma para medir ansiedad en roedores.

La ansiedad está íntimamente relacionada con alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica, por lo que es evidente que al aplicar fármacos que buscan disminuir la hiperexcitabilidad del SAG, se cuantifique los efectos de tales fármacos en la conducta tipo ansiosa que induce el SAG.

II. Justificación

Reducir los signos y síntomas de las abstinencias a su mínima expresión es un evento esperado en la terapéutica hospitalaria. Desde el punto de vista experimental este proceso puede tener un nuevo enfoque: nuestros resultados proponen lograr el bloqueo o la reducción de la hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA como consecuencia de la administración de un modulador alostérico positivo: progesterona y de CF_3HEPP , un análogo más potente del único fármaco que demostró inhibir de forma paulatina al SAG.

Esta tesis representa una aportación importante para plantear nuevas alternativas en el manejo farmacológico de epilepsias, ya que hoy sabemos, los mecanismos que subyacen a la actividad epileptiforme dependen de una alteración en el sistema GABAérgico.

Se pretende identificar si la aplicación de: progesterona, HEPP y CF_3HEPP disminuyen la hiperexcitabilidad del Síndrome de Abstinencia a GABA, y si la administración de estos fármacos modifican el perfil tipo ansioso que induce el SAG.

III. Objetivos

General

Disminuir la hiperexcitabilidad neuronal del SAG inducida en ratas de la cepa Wistar, mediante la aplicación sistémica de progesterona, HEPP o CF_3 HEPP.

Específicos

- Cuantificar la disminución en el número de complejos espigonda y potencia de la actividad electroencefalográfica característica del SAG inducido en la corteza cerebral somatomotora, como resultado de la administración de progesterona, HEPP o CF_3 HEPP en la rata con abstinencia a GABA.
- Medir los cambios en la conducta tipo ansiosa que se presenta en el SAG, mediante la cuantificación del número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados en el Laberinto Elevado en Cruz, posterior a la aplicación de progesterona, HEPP o CF_3 HEPP.

Variables de trabajo de la presente tesis

1) Independiente

- Retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA en la corteza somatomotora derecha para inducir el Síndrome de Abstinencia a GABA.

Dependientes

- Modificación de la excitabilidad cortical en la actividad electroencefalográfica (número de complejos espiga-onda y potencia característicos de la abstinencia) en ratas macho.
- Cambio de la conducta tipo ansiosa, identificada en el Laberinto Elevado en Cruz mediante la evaluación del número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados.

2) Independiente

- Aplicación de progesterona, HEPP o CF_3HEPP .

Dependientes

- Nivel de la excitabilidad cortical en el EEG cuantificado por cambios en la potencia y en el número de complejos espiga-onda característicos de la abstinencia.
- Número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados en el Laberinto Elevado en Cruz.

Hipótesis General

Si se aplica un tratamiento de progesterona o HEPP, o CF_3HEPP en ratas en condición de abstinencia a GABA, entonces habrá una disminución en la potencia electroencefalográfica y

número de complejos espiga-onda de la hiperexcitabilidad neuronal característica del SAG en la corteza somatomotora de la rata; los tratamientos administrados disminuirán los niveles de ansiedad que induce el SAG.

Hipótesis específicas

- 1) Si se aplica progesterona al inicio del SAG, entonces habrá una disminución en la hiperexcitabilidad neuronal, cuantificada por una menor potencia y frecuencia del EEG.
- 2) La aplicación de una dosis de HEPP o CF_3HEPP disminuirá la potencia y frecuencia del EEG en la corteza cerebral somatomotora de la rata con SAG.
- 3) En ratas con SAG, la administración de progesterona, HEPP o CF_3HEPP tendrá una disminución en la conducta tipo ansiosa que caracteriza al SAG, lo cual se traducirá en un menor número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados en el Laberinto Elevado en Cruz.

IV. Material y Método

Sujetos

Se utilizaron 80 ratas macho de la cepa Wistar (250-300g), proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" (INPRF), las cuales se mantuvieron en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25°C), agua y

alimento *ad libitum*, con ciclo de luz oscuridad invertido 12:12 hrs y de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de animales del laboratorio de la Academia Nacional de Medicina (1999); en todos los procedimientos experimentales se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales. Los sujetos de experimentación fueron alojados en cajas individuales de acrílico transparentes, y permanecieron así hasta el final del procedimiento. Cada uno de los experimentos se realizó durante el ciclo de oscuridad de las ratas macho.

Sustancias utilizadas en este estudio

Para la implantación del complejo cánula/electrodo conector se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (Pisabetal® 50 mg/Kg, México) diluido en cloruro de Sodio (J.T Baker®, USA). Como anestésico local se usó xylocaína® (AstraZeneca S.A de C.V solución inyectable al 2% /50ml).

Para disminuir la posibilidad de sepsis y de infección, se utilizaron antibiótico (bencilpenicilina Benzatinica, Amsa Laboratorios® antibióticos de México, S.A. de C.V), iodo povidona (Quiromed® 0.8%, México), antiséptico (Microdacyn®, Oculus Technologies de México), peróxido de hidrógeno (J.T Baker®, USA) y cloruro de benzalconio (Antibenzil®, México).

Para inducir hiperexcitabilidad neuronal tras el retiro abrupto de instilación intracortical de GABA (Sigma-Aldrich®, St Lois, MO U.S.A) en la corteza somatomotora derecha, se utilizó una dosis de 5

mM; 6 μ l/2h de GABA.

Se administró progesterona (45 mg/Kg; sc; Sigma-Aldrich®, St Lois, MO U.S.A); HEPP (50 mg/Kg; i.p; 3-hidroxy, 3-etil, 3-fenilpropionamida) y DL-di-CF₃-HEPP (10 mg/Kg; i.p.) con la finalidad de disminuir la hiperexcitabilidad neuronal que caracteriza al SAG.

Procedimientos

Cirugía Estereotáxica

Para la implantación del complejo cánula/electrodo conector se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.). Se aplicó lidocaína (0.1 ml) en cada conducto auditivo y se colocó a la rata en un sistema estereotáxico de una torre (Neuroscience Physiology Research Equipment Stoelting modelo Lab. Standard®), después se esterilizó la zona con isodine y se inyectó lidocaína (0.6 ml, sc) en el cuero cabelludo para realizar un corte en la piel. De acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998) se colocaron dos cánulas (Aguja BD Precision Needle®, 23mm x 25mm) de infusión intracortical a 1.5 mm de profundidad, 2 mm posterior a bregma y a 2.5 mm de la línea media para obtener la señal electroencefalográfica de la corteza somatomotora. Asimismo, se situaron 3 electrodos en el cráneo (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre, dos de registro colocados a 4 mm posterior a bregma y uno de referencia sin actividad anterior a bregma) para obtener la señal EEG de la capa superficial de la corteza cerebral. Las cánulas y los tres electrodos se soldaron a un

conector mediante un Cautín Steren® y Estaño para soldar Omega®; posteriormente se fijaron al cráneo con resina acrílica y monómero (Nic Tone Cross Linked®, mdc dental México). Todos los instrumentos de cirugía fueron esterilizados previamente con un Horno esterilizador CRAEdental®. Con el fin de asegurar la permeabilidad de las cánulas se les introdujo una “guía removible”. Al término de la cirugía se les administró un antibiótico de forma profiláctica. Los animales permanecieron una semana en reposo antes de cualquier manipulación.

Registro de la actividad electroencefalográfica (EEG)

El registro electroencefalográfico se llevó a cabo en un cuarto aislado faradizado, la señal fue adquirida con un cable de registro (5 terminales faradizadas) adaptado a conexión directa con amplificadores (P511 AC amplifier GRASS Astro Med In.) La amplificación fue de 20, con filtros de baja (3 Hz/1000) y alta frecuencia (0.3 KHz). Para traducir esta señal se utilizó el software Poliview 8 (National Instruments). Los registros tuvieron una duración de tres horas en los animales en los que se indujo la abstinencia (una hora de registro para constatar la hiperexcitabilidad neuronal del SAG y dos horas de registro posteriores a la aplicación de progesterona, HEPP o CF_3 HEPP. Los registros control así como los seguimientos tuvieron una duración de 30 min. Los datos electrofisiológicos se analizaron con el Software Adq4ch mediante el uso de filtros digitales de 0-40 Hz y eliminación de saturación. Se obtuvo el valor de la potencia total del EEG ($\mu V^2/Hz$) en la banda de frecuencia de 4-20

Hz a partir del espectro de frecuencia de Wavelets.

El conteo de espigas se realizó mediante la identificación de las primeras 10 espigas representativas después del inicio del SAG. Posteriormente se promediaron los valores obtenidos para establecer un nivel de disparo a partir del cual se cuantificó el número de complejos espiga-onda.

Inducción del Síndrome de Abstinencia a GABA

Para generar la abstinencia a GABA se realizó la instilación intracortical de GABA (5mM) en la corteza somatomotora derecha utilizando una bomba de instilación programable (Kd Scientific®), una microjeringa (Hamilton Co. Reno) y una manguera de instilación. Se instiló a una velocidad de 3 μ l por hora, durante 2 h. Inmediatamente después de la interrupción de la instilación se registró la actividad electroencefalográfica para evaluar los cambios en la excitabilidad neuronal durante 2 h.

Prueba del Laberinto elevado en cruz (LEC)

El laberinto es una estructura de madera en forma de cruz, elevada a 50 cm del piso con 4 brazos: un par con paredes de 40 cm de alto denominados brazos cerrados (BC) de 50 x 10 cm cada uno y otro par con las mismas dimensiones llamados brazos abiertos (BA). Los cuatro brazos se encuentran unidos por un cuadro central de 10 x 10 cm. El cuarto donde se realiza la prueba debe estar iluminado con luz roja (40W).

Se colocó a la rata en el centro del LEC con la cabeza hacia uno de los BA y se le dejó explorar libremente el LEC durante 5 min. Se evaluó: 1) el número de entradas a BA y BC; así como 2) el porcentaje de tiempo en cada uno de los brazos. El criterio para considerar una entrada es que la rata cruce con las cuatro patas hacia el interior de los mismos.

En este paradigma un incremento en el tiempo de permanencia y el número de entradas a BC es interpretado como la respuesta ansiogénica, mientras que el número total de entradas a ambos brazos proporciona una medida de la actividad general (Fernández- Guasti y Picazo, 1999; Pellow et al., 1985). La prueba fue registrada mediante el uso de una cámara de video (Sony HandycamMod DCR SX40) adaptada a una tarjeta digital de PC para almacenar los videos en una computadora PC (HP/compac 6000; software ENLTV).

Análisis de datos

Los resultados se expresan en medias con su respectivo error estándar (EE). Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para cada una de las variables dependientes, con una significancia de $p \leq 0.05$, seguida de una prueba *Post Hoc* de Dunette mediante el uso de los paquetes estadísticos GraphPad, OriginPro 8 y SigmaPlot 11.0.

El análisis de los resultados electroencefalográficos consistió en cuantificar el número de espigas y el aumento de la amplitud mediante el análisis de frecuencia de Wavelets. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un análisis de varianza de un factor haciendo una comparación intra y entre grupos con un valor de $p \leq 0.05$ (ANOVA *Post Hoc*: Tukey).

La evolución electrofisiológica se consideró como un estudio longitudinal donde se cuantificaron los complejos espiga-onda y se evaluó el aumento de la amplitud entre ambas cortezas somatomotoras, la que recibió instilación intracortical de GABA y la contralateral (ANOVA, *Post Hoc*: Tukey).

Los datos obtenidos del LEC, son mostrados en proporción, tanto en número de entradas, así como porcentaje de tiempo siguiendo esta ecuación:

$$\frac{t_{Bx}}{t_{Bx} + t_{Bx}} \times 100$$

Donde t es el tiempo y x es el brazo en el que ha permanecido, se siguió la misma ecuación para el número de entradas. Los resultados conductuales fueron analizados con una ANOVA, *Post Hoc*: Tukey.

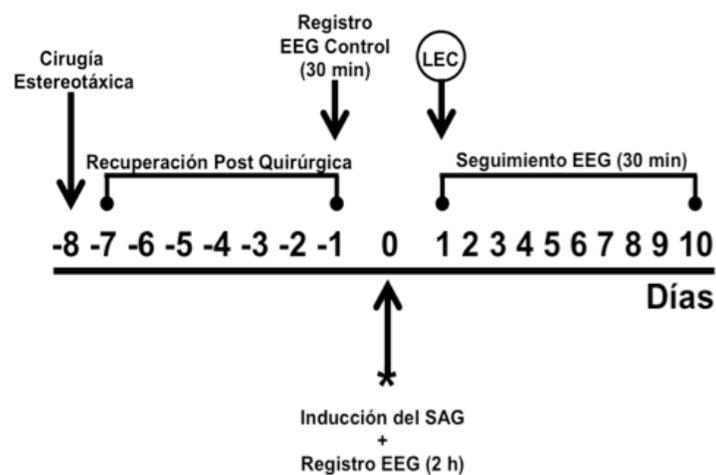
Procedimiento Experimental

Cada condición contó con ratas asignadas aleatoriamente en uno de 10 grupos. La n de cada uno de los grupos fue de 8 ratas.

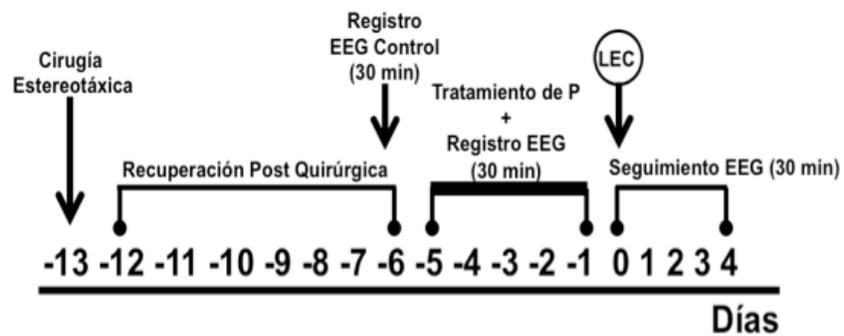
En todos los grupos restantes se dejó una semana de recuperación posterior a la cirugía estereotáxica, al día siguiente se realizó un registro EEG de 30 min de duración con el propósito de obtener datos basales de la actividad electroencefalográfica y se procedió con el tratamiento específico de cada grupo, al finalizar éste se realizó la evaluación conductual de ansiedad con el LEC.

Grupo 3: El propósito de este grupo fue replicar y estandarizar la señal EEG del SAG para lo cual se indujo el Síndrome de Abstinencia a GABA en la corteza somatomotora derecha (n = 8). Se registró la actividad EEG durante las dos primeras horas posteriores a la instilación y en los 10 días siguientes durante 30 min.

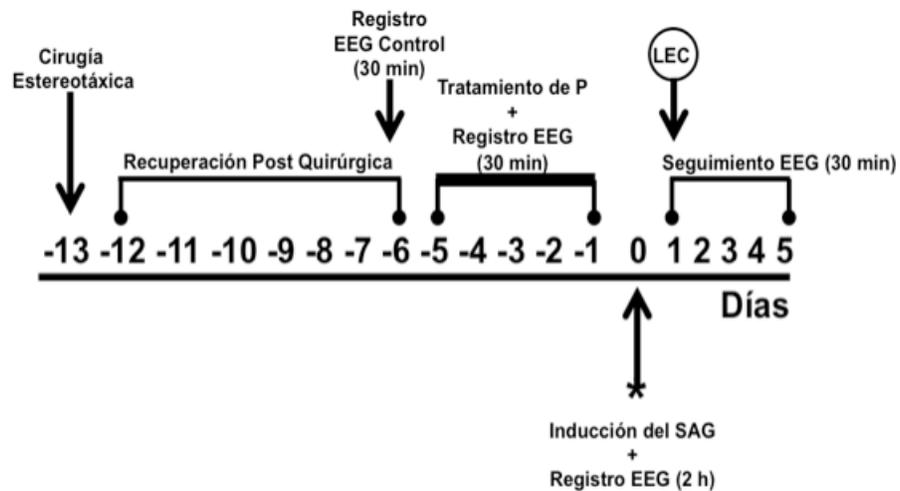
Se cuantificó el número de espigas, los cambios en la potencia y frecuencia del EEG del SAG.



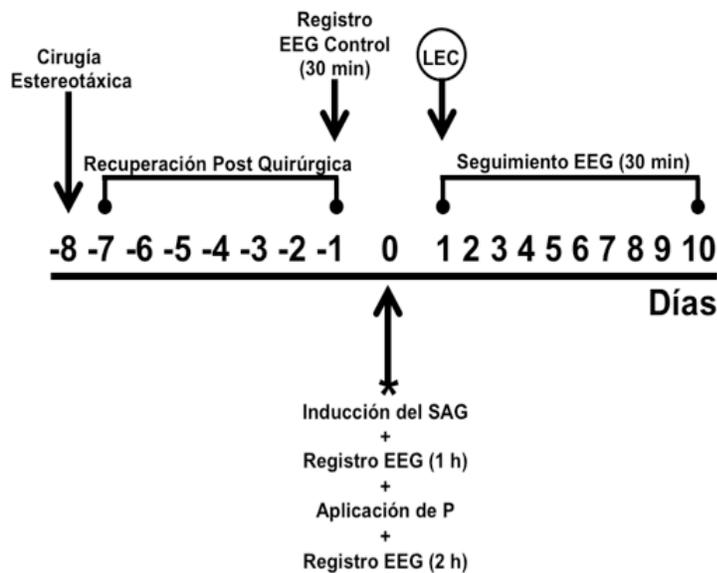
Grupo 4: Este grupo se realizó para identificar que la aplicación de un tratamiento de P (n = 8; 45 mg/Kg, s.c.) durante 5 días, no genera abstinencia ni modificaciones en la potencia y frecuencia del EEG en la rata macho. Se aplicó una dosis diaria de P durante 5 días, el día 6 se interrumpió el tratamiento y se inició con los seguimientos de registro EEG de 30 minutos durante los 5 días siguientes.



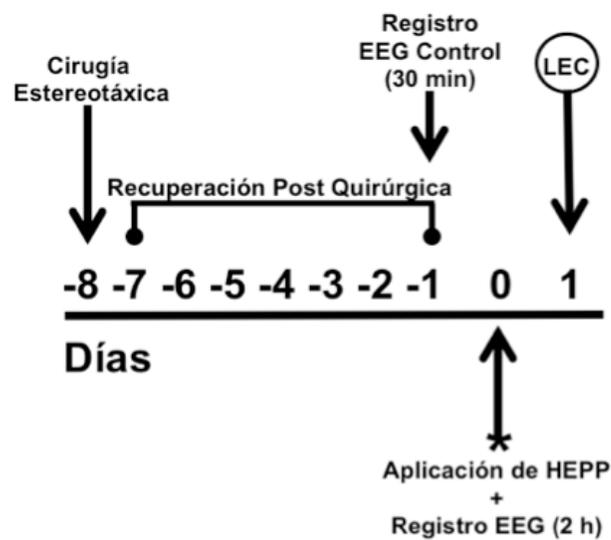
Grupo 5: En este grupo se evaluó si la aplicación previa de 5 días de P ($n = 8$; 45 mg/Kg, s.c.) en ratas a las cuales se les indujo el SAG, disminuye la hiperexcitabilidad neuronal. La disminución se cuantificó por una menor potencia, frecuencia y menor número de espigas del EEG. Al sexto día de tratamiento de P, se indujo hiperexcitabilidad neuronal tras el retiro abrupto de instilación intracortical de GABA (5mM; 6 μ l/2h) en la corteza somatomotora derecha, inmediatamente después se obtuvo el registro EEG durante 2 h. Al día siguiente se inició con el seguimiento EEG de 30 minutos durante 5 días.



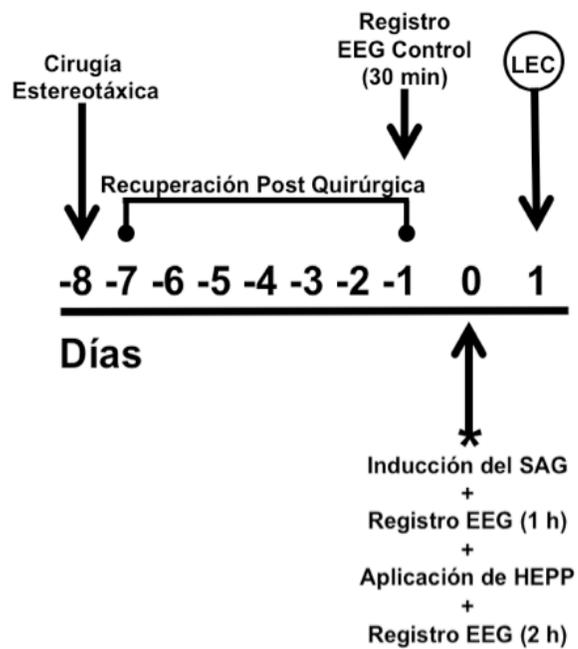
Grupo 6: Estudios *in vitro* previos indican que la hiperexcitabilidad neuronal se inhibe con una sola aplicación de alopregnanolona, por lo que con este grupo se buscó identificar si la aplicación de una sola dosis de P ($n = 8$; 45 mg/Kg; s.c) en una rata a la que se le indujo SAG, es capaz de disminuir la potencia, frecuencia, el número de espigas del EEG y la conducta tipo ansiosa. En este grupo se indujo la hiperexcitabilidad neuronal, se registró durante la primera hora del SAG y posteriormente se aplicó una dosis de P; se continuó con el registro EEG que duró 2 horas más. Al día siguiente se inició con el seguimiento EEG de 30 minutos durante 10 días.



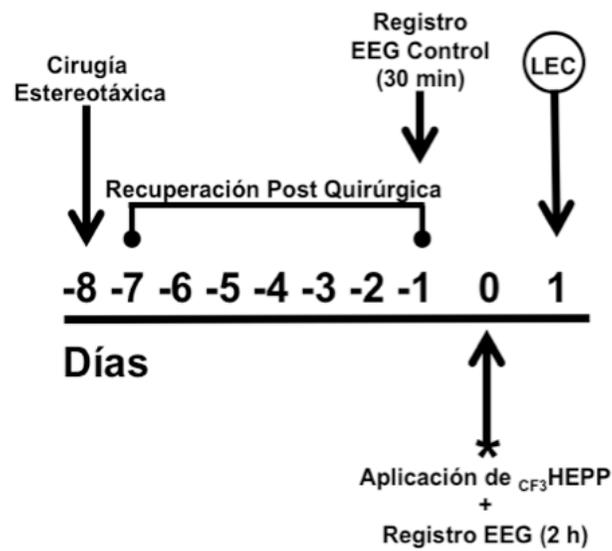
Grupo 7: En investigaciones anteriores se encontró que el HEPP inhibe la hiperexcitabilidad neuronal, sin embargo no se sabe cuál es el efecto de este fármaco sobre el EEG de la rata sin SAG. El propósito de este grupo fue determinar si una dosis de HEPP (n = 8; 50 mg/Kg; i.p) modificaba la potencia del EEG y si generaba conducta tipo ansiosa en la rata. Se realizó un registro EEG de 2 horas posterior a la aplicación del HEPP.



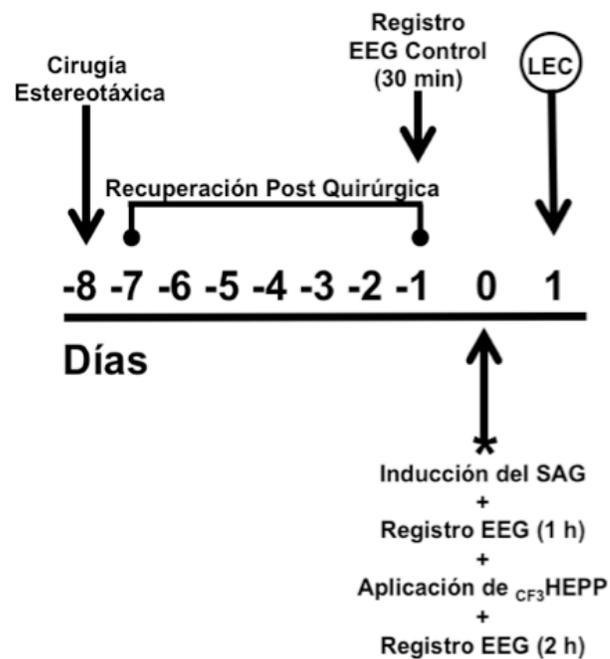
Grupo 8: El propósito de este grupo fue replicar la inhibición del SAG por parte del HEPP, además de cuantificar la disminución de potencia y número de espigas del EEG, este grupo nos permitió saber si el HEPP disminuye la conducta tipo ansiosa que caracteriza al SAG. En este grupo después de inducir la abstinencia a GABA se realizó un registro EEG de 1 hora para constatar la hiperexcitabilidad neuronal, después se aplicó el HEPP (n = 8; 50 mg/Kg; i.p) y se continuó con el registro que duró 2 horas más.



Grupo 9: Los resultados de este grupo nos indicaron si una dosis de CF_3 HEPP (n = 8; 10 mg/Kg, i.p) tiene efecto en la potencia del EEG de la rata macho. Para cuantificar los efectos en la potencia se realizó un registro EEG de 2 horas posterior a la aplicación del fármaco. Este grupo también nos permitió saber si el genera conducta tipo ansiosa.



Grupo 10: Este grupo nos permitió saber si la aplicación de una dosis de CF_3 HEPP ($n = 8$; 10 mg/Kg, i.p), un derivado del HEPP, también inhibe el SAG. Además de cuantificar la disminución de potencia y el número de espigas del EEG, se analizó la conducta tipo ansiosa mediante el LEC para determinar si el fármaco tiene efectos en la ansiedad que caracteriza al SAG. Se siguió el mismo procedimiento que en el grupo 6, pero en este grupo la variable independiente fue la aplicación del CF_3 HEPP.



V. Resultados

Análisis Electrofisiológico del SAG

El primer planteamiento de esta tesis fue realizar un análisis electrofisiológico que identificara la hiperexcitabilidad neuronal causada por el SAG, que funcionara como parámetro de comparación y marco de análisis a través del número de complejos espiga-onda y la potencia de la actividad cortical.

Utilizamos el análisis de Wavelets el cual nos permite realizar un seguimiento electrofisiológico temporal en distintas bandas de frecuencia de la señal.

En la Fig. 4 identificamos la evolución cuantitativa que tiene el EEG antes, durante y después de la inducción de la abstinencia a GABA.

El SAG se caracteriza por un aumento de potencia en la banda de frecuencia de 4-20 Hz y por la aparición de complejos espiga-onda los cuales van disminuyendo de forma gradual hasta llegar a niveles basales en el día 10 después de la inducción. La hiperexcitabilidad que lo caracteriza se observa en los trazos representativos del análisis de Wavelets con colores rojos-amarillos (Fig. 4).

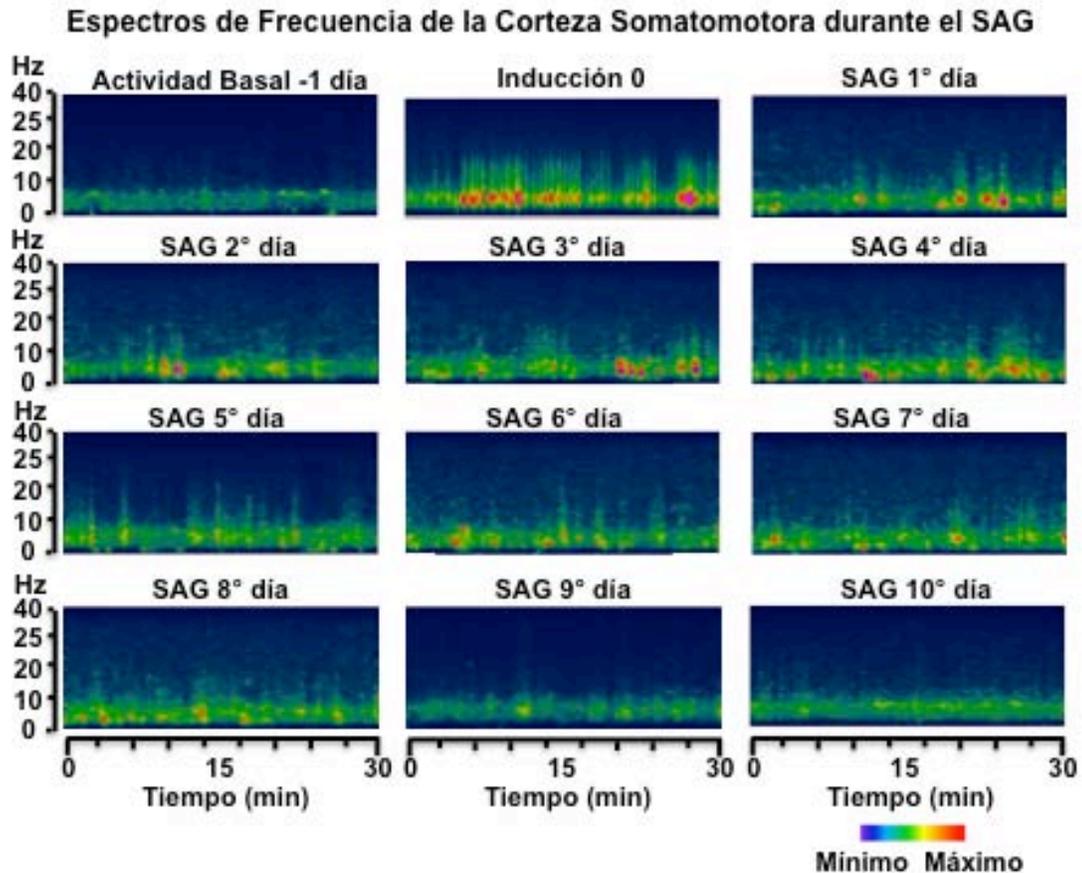


Figura 4. Espectros de frecuencia representativos de la Cx somatomotora derecha-instilada de una rata; seguimiento de registro electrofisiológico durante 10 días. El aumento en la potencia se refleja en la aparición del color rojo, mientras que el color azul indica menor actividad. Nótese que la actividad EEG incrementa significativamente los primeros días de abstinencia (1-2); gradualmente se cuantifica una disminución de la hiperexcitabilidad que dura en promedio 10 días (7-10).

La potencia promedio del EEG antes de la manipulación farmacológica fue de $511.8 \pm 1.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio instilado y de $493.3 \pm 3.13 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el contralateral. La manifestación espectral de esta actividad cortical basal se representa en colores azules-verdes en la gráfica del espectro (Fig. 4, día -1). El análisis electrofisiológico indicó que no hubo actividad espiga-onda, cambios de amplitud o frecuencia en la corteza cerebral.

Al realizar el análisis cuantitativo del espectro de frecuencia de 4-20 Hz en ambos hemisferios durante en el día de inducción del SAG (día 0), se identificó que la potencia tuvo un promedio de $959.3 \pm 2.13 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio instilado, incremento correspondiente al 187.4% comparado con la condición basal (Fig. 5, círculos negros, $p \leq 0.001$). En el hemisferio cerebral contralateral el incremento fue de $872 \pm 1.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ correspondiente a un incremento de 176.7% comparado con las condiciones basales (Fig. 5, círculos blancos, $p \leq 0.001$).

La potencia del EEG disminuye gradualmente en la evolución temporal de la abstinencia; es necesario enfatizar que la potencia del registro es significativamente mayor en el hemisferio instilado comparado con el contralateral ($p \leq 0.001$).

Se cuantificó el número de complejos espiga-onda de alta amplitud y frecuencia del EEG en el SAG, actividad que caracteriza a fenómenos de hiperexcitabilidad neuronal como las epilepsias. En la Fig. 6, panel I, se muestran trazos electroencefalográficos

representativos de la condición control (A, día -1), del día de inducción del SAG (B, día 0) y del día 10 de seguimiento (C).

Análisis Cuantitativo del Espectro de Frecuencia de 4 a 20 HZ en ambos Hemisferios durante el SAG

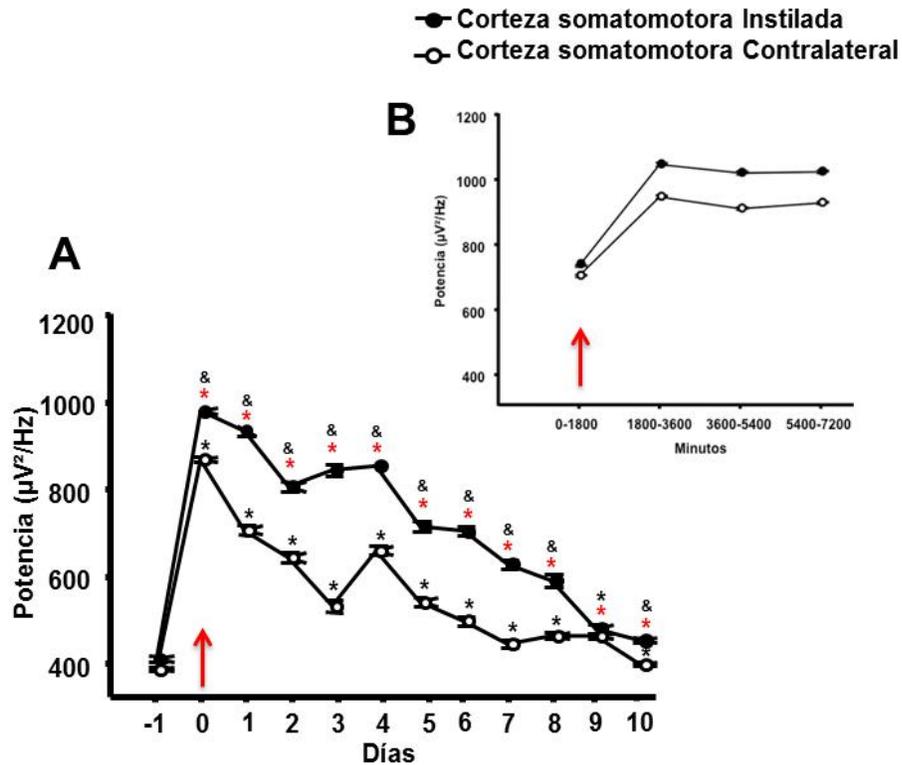


Figura 5. Análisis cuantitativo del SAG en su espectro de frecuencia (4-20 Hz/30 min) durante 10 días. En A se muestra el cambio en la potencia del EEG ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) del día control al día 10 de seguimiento; B corresponde al análisis cuantitativo de los cambios de potencia durante dos horas del SAG, representado en cuatro bloques de 30 min. Cx somatomotora instilada con GABA (círculos negros, ●; n=8) y Cx somatomotora contralateral (círculos blancos, ○; n=8). Inducción del SAG indicada con una flecha roja. Media \pm Error Estándar (EE). ANOVA Post Hoc Tukey (* $p \leq 0.001$ intra grupos, & $p \leq 0.001$ entre grupos).

El análisis del número de espigas mostró que en el día de inducción del SAG (día 0), el hemisferio instilado manifiesta en promedio 2198.5 ± 130 en un periodo de 30 min (Fig. 6, panel II; círculos negros, $p \leq 0.001$). En el día 1 de la abstinencia, el promedio de complejos fue de 1402 ± 133 , lo que representa una disminución del 41.23% comparado al día de inducción en forma significativa. El número de complejos espiga-onda disminuye en el curso temporal del fenómeno, llegando a niveles cercanos al control en el día 8 después de la inducción.

A diferencia de lo que ocurre en el hemisferio instilado, la corteza contralateral solo tuvo un incremento significativo en el número de complejos espiga-onda el día de la inducción (día 0), en el que el promedio fue de 1292 ± 105 (Fig. 6, panel II, círculos blancos, $p \leq 0.001$) y corresponde al 41.23% de la activación del hemisferio instilado. Es evidente que la disminución súbita de la actividad epileptiforme es a partir del día 1 del SAG en la corteza contralateral.

Esta serie de resultados electrofisiológicos confirmaron lo descrito anteriormente respecto al SAG: 1) la interrupción abrupta de la instilación intracortical de GABA genera un aumento de la potencia del EEG y la aparición de complejos espiga-onda el día de inducción, que gradualmente regresan a niveles basales en el día 10. 2) La actividad epileptiforme del hemisferio instilado se propaga al hemisferio contralateral, principalmente en los estadios iniciales.

Incremento de la Actividad neuronal de la Corteza Somatomotora durante el SAG

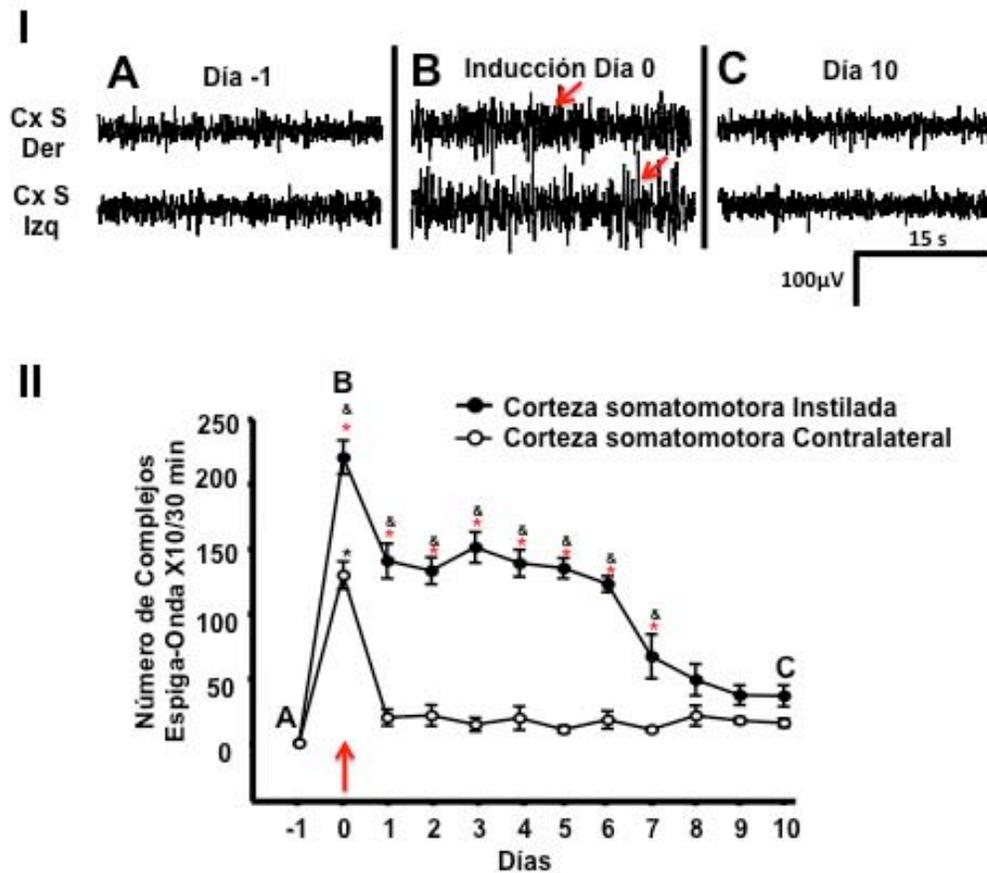


Figura 6. Trazos representativos de un animal y cuantificación de complejos espiga-onda. Panel superior: **I**, en **A** se aprecia la actividad EEG basal (día -1). En **B**, es evidente la aparición de complejos epileptiformes el día de la inducción del SAG (día 0) y en **C** se exhibe la ausencia de actividad epileptiforme en el día 10 después de la inducción del SAG. (Cx S: corteza somatomotora, Der: derecha/instilada; Izq: izquierda/contralateral). En **II** se grafican los complejos espiga-onda de la Cx somatomotora instilada (círculos negros, ●; n=8) y de la Cx somatomotora contralateral (círculos blancos, ○; n=8). Inducción del SAG indicada con una flecha roja. Media \pm Error Estándar (EE) ANOVA Post Hoc Tukey (* $p \leq 0.001$ intra grupos, & $p \leq 0.001$ entre grupos).

La aplicación de Progesterona durante 5 días modifica el EEG pero no genera abstinencia

La aplicación corta de agonistas del receptor $GABA_A$ disminuye la expresión de abstinencias o pueden bloquear una hiperexcitabilidad, este es el único requisito farmacológico, para que un agonista no genere abstinencia, con esta premisa realizamos el siguiente grupo de trabajo.

Resultados previos de nuestra línea de investigación indican que la aplicación de P durante 7 días (45mg/Kg; s.c.) genera un potente síndrome de abstinencia (Mejía, 2013). Por lo que consideramos en esta tesis necesario identificar en el EEG, si la aplicación de un tratamiento de 5 días de P generaba abstinencia.

En la Fig. 7 identificamos la evolución de la señal EEG antes, durante y después de la aplicación de 5 días de P (45mg/Kg; s.c.). En el registro control, el análisis de la frecuencia de 4-20 Hz mostró una actividad basal con predominio de ondas rápidas de pequeña amplitud, representada en el análisis de Wavelets con colores verdes-azules (Fig. 7, Actividad Control). En contraste, identificamos que durante los días 2 y 4 de la aplicación de P y en los días 6 y 7, después de la aplicación de P, durante el seguimiento EEG, mostró un aumento a expensas de ondas lentas, en la potencia en la banda de frecuencia de 4-10 Hz, que se representa gráficamente por la aparición de tonalidades amarillas en el análisis de Wavelets.

La aplicación de Progesterona induce la aparición de ondas lentas en el EEG pero no genera abstinencia

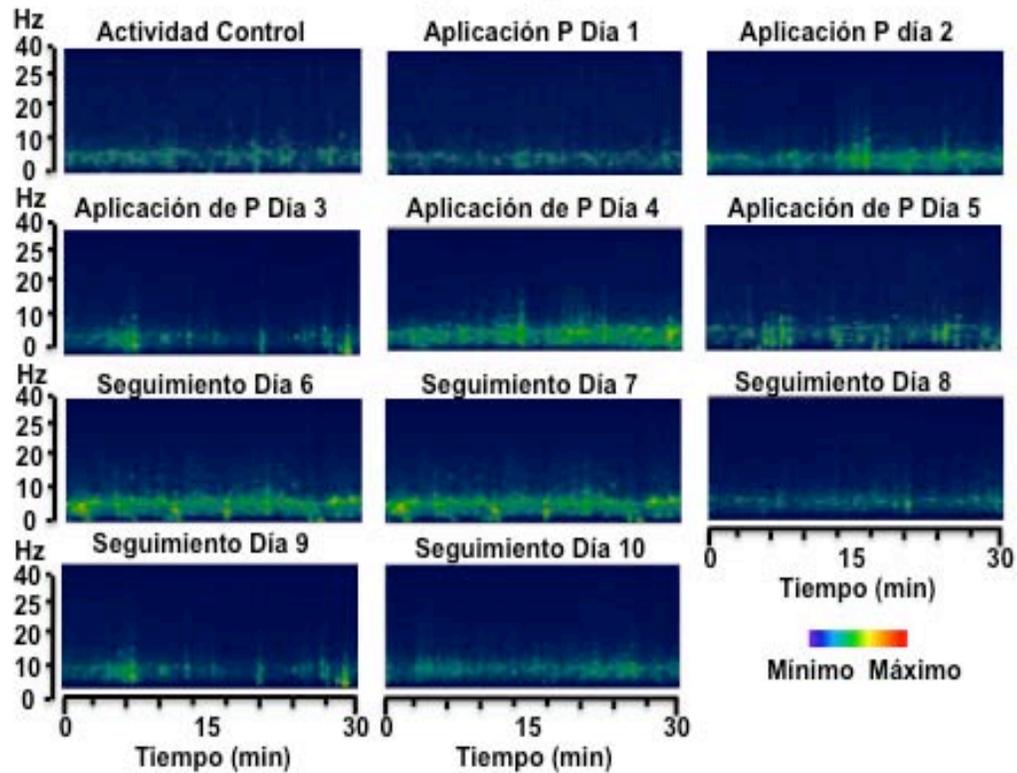


Figura 7. Espectros de frecuencia representativos de la Cx somatomotora derecha de una rata; seguimiento del registro electrofisiológico durante la aplicación de P (5 días) y seguimientos (5 días). El aumento en la potencia se refleja en la aparición de colores cálidos, mientras que el color azul indica menor actividad. Nótese que la actividad se encuentra incrementada durante los días 2 y 4 de la aplicación de P (45mg/Kg; s.c.), y durante los días 6 y 7 del seguimiento electroencefalográfico. Gradualmente se cuantifica una disminución de la actividad electroencefalográfica (días 8-10).

En la Fig. 8 de esta tesis se presentan trazos representativos de un animal, de esta serie de experimentos en relación a la evolución de la actividad EEG durante el registro control (A), aplicación de P (B-C) y seguimientos (D-E) de ambos hemisferios.

La potencia promedio del EEG antes de la manipulación farmacológica fue de $454.2 \pm 1.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio derecho y de $428.5 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio izquierdo (Fig. 8, F). Al realizar el análisis cuantitativo del espectro de frecuencia de 4-20Hz en ambos hemisferios cerebrales durante la aplicación de P, se mostró que la potencia tuvo un incremento significativo en la corteza somatomotora derecha (F, círculos negros, $p \leq 0.001$) comparado al día control (día 1).

Al realizar un análisis del EEG entre ambos hemisferios cerebrales, cuantificamos datos significativos. En el hemisferio derecho, los días en los que se presentó mayor potencia fueron el día 2 y 5 de aplicación de P con un promedio de $484.1 \pm 2.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ y $524.1 \pm 3.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ respectivamente, lo que corresponde a un aumento del 6.5% (día 2) y 15.36% (día 5), comparado con el registro control ($p \leq 0.001$). Durante los seguimientos, los días 6 y 7 tuvieron un promedio de activación cortical de $529 \pm 4.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ y $558.8 \pm 4.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, lo que se traduce en un incremento del 16.4% y 23% respectivamente, en comparación a la actividad basal.

La administración crónica de Progesterona no induce abstinencia

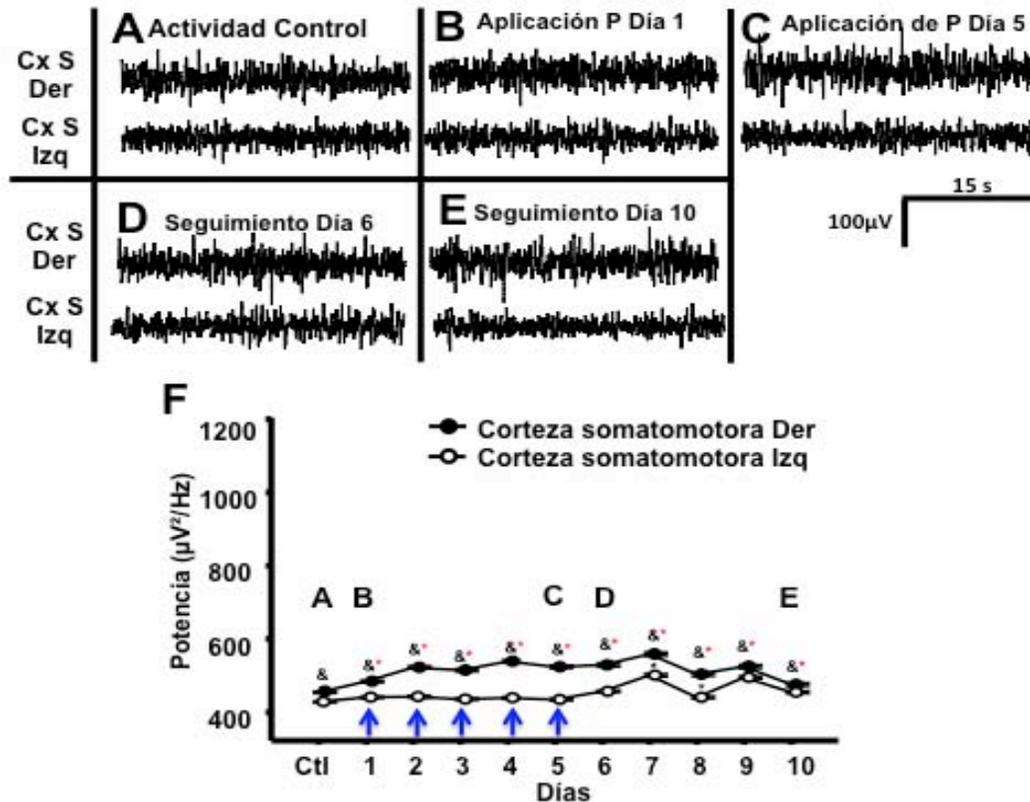


Figura 8. Trazos EEG representativos en cinco fases del experimento (A-E) y análisis cuantitativo del espectro de frecuencia (F; 4-20 Hz/30 min) en ambos hemisferios de la aplicación crónica de P. En A se aprecia la actividad basal (día 1), en B y C se expone la actividad EEG durante la primera y quinta aplicación de P (día 1 y 5). En D y E se presentan trazos representativos del EEG en los días 6 y 10. (Cx S: corteza somatomotora, Der: derecha; Izq: izquierda). En F, se grafica la cuantificación de la potencia del EEG durante los días de aplicación de P (flechas azules, ↑; 45mg/Kg; s.c) y a través de los siguientes 5 días de seguimiento electroencefalográfico. La Cx somatomotora derecha (círculos negros, ●; n=8) manifiesta mayor potencia que la Cx contralateral (círculos blancos, ○; n=8). La aplicación diaria de P, sí modifica la morfología del EEG pero no genera la aparición de complejos espiga-onda. Media ± Error Estándar (EE). ANOVA Post Hoc Tukey (*p≤0.001 intra grupos, & p≤0.001 entre grupos).

En el hemisferio izquierdo, solo el día 7 se presentó un aumento significativo del 16.9% de la potencia electroencefalográfica en comparación al día control. El promedio de potencia fue de $501 \pm 4 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ (F, círculos blancos, $p \leq 0.001$).

Los resultados que arroja este grupo son: 1) la potencia de EEG posterior a la aplicación de P, del hemisferio derecho es significativamente mayor que la actividad del hemisferio izquierdo ($p \leq 0.001$). 2) La aplicación de un tratamiento de 5 días de P aumenta la potencia total del EEG, pero no induce la aparición de complejos espiga-onda, es decir que el tratamiento no genera abstinencia.

La aplicación de Progesterona reduce el SAG

La aplicación de alopregnanolona a rebanadas de cerebro con abstinencia a GABA, inhibe la hiperexcitabilidad. Es decir, la abstinencia a GABA es susceptible de reducirse si un agonista del receptor GABA_A modifica la estructura proteica del mismo antes de que el GABA reconozca a su receptor. Estos resultados plantean una alternativa en el manejo farmacológico de abstinencias que involucran esta neurotransmisión.

La siguiente serie de experimentos estuvo orientada a identificar por primera vez, a través del registro EEG, si la aplicación de P reducía el SAG. Se compararon tres grupos, el primero consistió en el grupo al que se le indujo SAG, el segundo en la aplicación de un tratamiento de P (Progesterona Crónica, 5 días, 45mg/Kg; s.c.) previo a la inducción del SAG y el tercero en la

aplicación de una única dosis de P (Progesterona Aguda, 45mg/Kg; s.c.) posterior a la inducción de la abstinencia a GABA.

En la Fig. 9 identificamos la evolución EEG temporal del hemisferio derecho de los tres grupos: A) SAG, B) Progesterona Crónica previa al SAG y C) Progesterona Aguda posterior al SAG en distintas condiciones: día control (-1), día de inducción de SAG (0), seguimiento EEG 1, 5 y 10 días.

La actividad EEG control durante un periodo de 30 min, identificó un patrón de frecuencia rápida con baja amplitud, lo cual coincide con la actividad basal semejante a todos los grupos control que se han realizado en esta tesis. El análisis cuantitativo de Wavelets identificó que la banda de frecuencia basal correspondió a un espectro de 5-7 Hz y una potencia promedio de $511.8 \pm 4.7 \mu V^2/Hz$. La manifestación del espectro en color de esta actividad cortical fue representada en azules-verdes en la gráfica del espectro de potencia (Fig. 9, Actividad Control: paneles superiores A, B y C).

En A (Fig. 9) se muestran los trazos representativos del análisis de Wavelets del SAG, como se describió previamente en esta tesis, en el día de inducción (día 0) se observa un aumento de potencia en las bandas de frecuencia de 4-20Hz señalado por la aparición de colores rojos; la hiperexcitabilidad tiene una duración de 10 días, la cual va disminuyendo de forma paulatina hasta llegar a niveles basales.

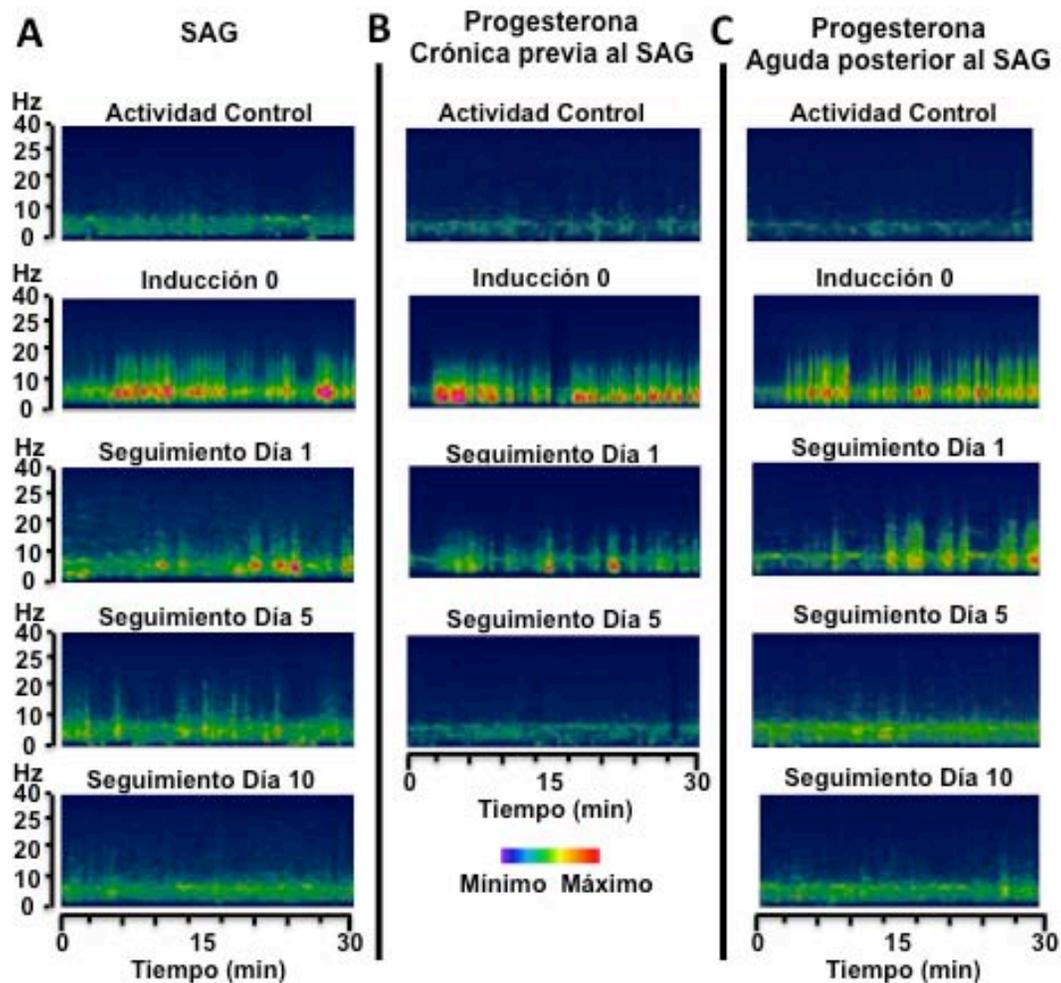


Figura 9. Espectros de frecuencia representativos de la Cx somatomotora derecha. En la columna **A**, a la izquierda, se muestran los registros representativos de un animal con SAG, la hiperexcitabilidad dura 10 días. En la columna **B**, al centro, corresponde al espectro representativo del tratamiento de P (5 días, 45mg/Kg; s.c) previo a la inducción de SAG (**Progesterona Crónica**), el cual disminuye el SAG. La columna **C**, a la derecha, corresponde a la aplicación de una dosis de P (45mg/Kg; s.c., **Progesterona Aguda**) posterior a la inducción del SAG, la cual sólo disminuye la hiperexcitabilidad en la Cx contralateral. El aumento en la potencia se refleja en la aparición de color rojo, mientras que en menor actividad cortical predomina el color verde-azul.

En B de la Fig. 9 (Progesterona Crónica previa al SAG) se identificó en colores rojos que durante el día de inducción (día 0) aumenta la potencia en la banda de frecuencia de 4-20 Hz al igual que en el grupo de SAG (A). Sin embargo, es importante notar que la hiperexcitabilidad solo duró 5 días, la disminución de la potencia es evidente después del tratamiento. En C, el grupo de Progesterona Aguda posterior al SAG, la hiperexcitabilidad regresa a niveles basales hasta el día 10 (Fig. 9). Es decir, no hay diferencias significativas con el grupo de SAG, solo la aplicación crónica de P reduce el SAG.

El análisis cuantitativo del cambio de potencia de estos tres grupos se gráfica en la Fig. 10 A-B. En el hemisferio instilado, en el día de inducción del SAG (día 0) la aplicación de P previo a la abstinencia (círculos azules) tuvo una potencia promedio de $1001.9 \pm 7.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, lo cual en comparación con el Grupo SAG ($956.7 \pm 5.2 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; círculos negros, $p \leq 0.001$) consistió en un aumento del 4.7%. En el día 1 de abstinencia, se aprecia el efecto reductor de la hiperexcitabilidad neuronal que tuvo el tratamiento crónico de P, la potencia disminuyó significativamente a un promedio de $621.4 \pm 8.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, lo cual se traduce en un 17.8% menos de hiperexcitabilidad del SAG ($756.3 \pm 7.2 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; $p \leq 0.001$).

La aplicación de Progesterona previo a la inducción del SAG disminuye la hiperexcitabilidad neuronal

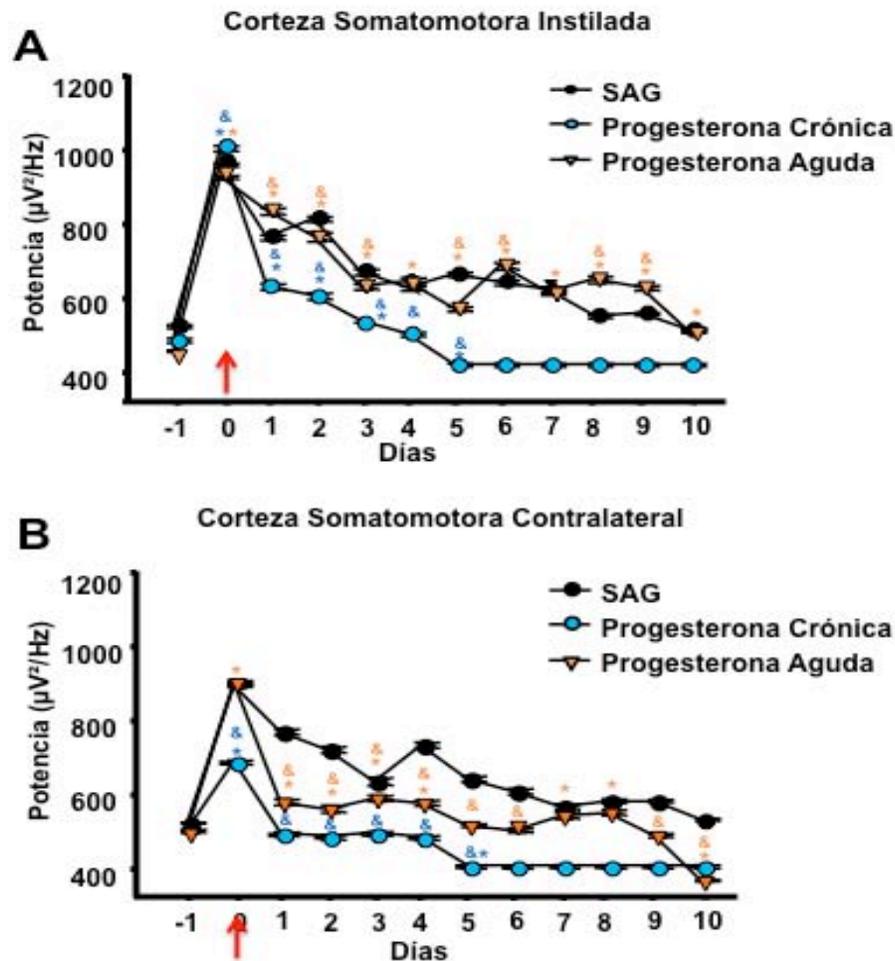


Figura 10. Análisis cuantitativo de la disminución en la potencia del EEG en ambos hemisferios, en la banda de 4-20 Hz/30 min. Se muestra el cambio en la potencia del EEG ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) en **A** la Cx somatomotora instilada con GABA y en **B** la Cx contralateral. Grupos, **SAG**: inducción del SAG (círculos negros, ●; n=8); La aplicación de **Progesterona Crónica** (45mg/Kg; s.c.) previo a la inducción de SAG sí reduce la manifestación del síndrome (círculos azules, ●; n=8); La aplicación de P una vez inducido el **SAG (Progesterona Aguda**, 45mg/Kg; s.c; triángulos naranjas, ▼, n=8) no modifica la potencia en el hemisferio instilado, pero sí el contralateral. La Inducción del SAG se indica con una flecha roja. ANOVA Post Hoc Tukey (* $p \leq 0.001$ intra grupos, & $p \leq 0.001$ entre grupos).

Este efecto de reducción del SAG se mantuvo, contrastando que la duración de la actividad epileptiforme del SAG es de 10 días, este grupo presentó 5 días de duración. En el día 5, la potencia disminuyó significativamente ($p \leq 0.001$) en el grupo de P Crónica comparado con el grupo SAG, regresando a niveles control en el día 5 posterior a la inducción. Esto se traduce a que la aplicación de P de manera previa a la inducción del SAG, disminuye la hiperexcitabilidad en su potencia en un 17.8% y en 50% la duración de la abstinencia.

En el hemisferio contralateral (Fig. 10-B) en el día de inducción, solo la P crónica disminuyó significativamente la potencia del SAG ($743.8 \pm 8.4 \mu V^2/Hz$, $p \leq 0.001$) a un promedio de $462.3 \pm 5.9 \mu V^2/Hz$. Durante los días posteriores a la inducción del SAG, la aplicación de P aguda o crónica disminuye significativamente la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal ($p \leq 0.001$).

La aplicación de un tratamiento crónico de P reduce el SAG y no induce abstinencia. La pregunta fue si la administración de una dosis única de P tendría efecto en la inducción y mantenimiento de la abstinencia.

La aplicación aguda de P (Fig. 10, triángulos naranjas) a diferencia de la administración crónica, no tiene diferencias significativas con el grupo SAG ($956.7 \pm 5.2 \mu V^2/Hz$, círculos negros) en el día de inducción del SAG (0). Este día se cuantificó una potencia de $922.4 \pm 12.9 \mu V^2/Hz$. Identificamos que la

hiperexcitabilidad neuronal es inconstante en su comportamiento después de la aplicación de P posterior a la inducción del SAG,

La aplicación de Progesterona disminuye la Hiperexcitabilidad del SAG

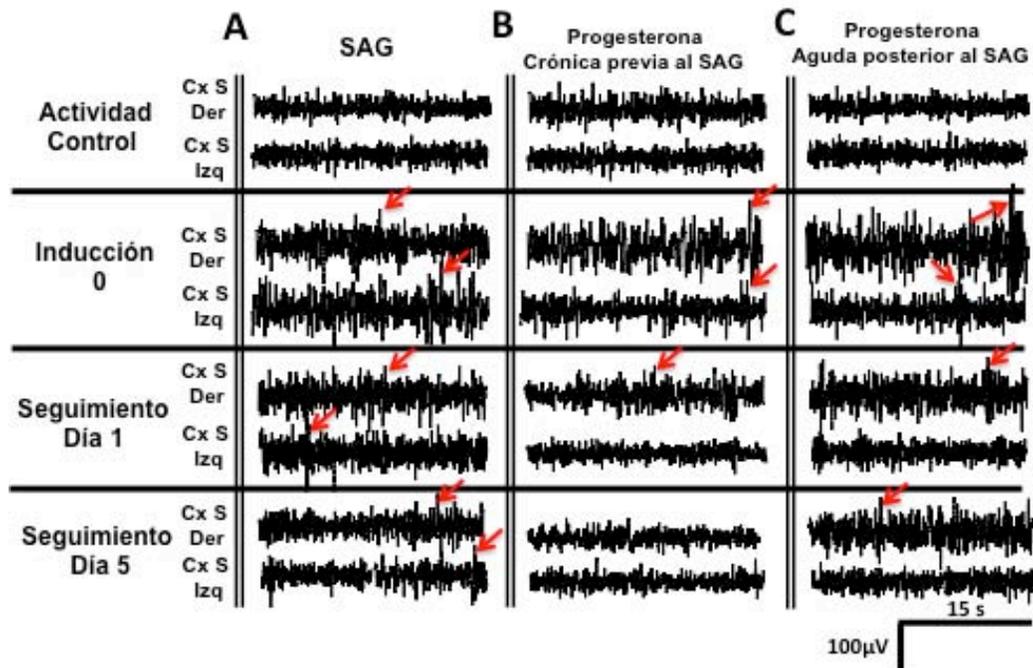


Figura 11. La aplicación crónica y aguda de P disminuyen la hiperexcitabilidad del SAG, trazos EEG representativos en cuatro fases del experimento, en ambos hemisferios. En el panel superior se observa la actividad eléctrica basal de los tres grupos. En la inducción es evidente la presencia de complejos espiga-onda característicos de la fase inicial del SAG (día 0) en los tres grupos (A,B,C). En el cuarto panel, en B, se observa la ausencia de actividad epileptiforme en el día 5 posterior a la inducción del SAG. **Grupos.** A: inducción de SAG, B: ratas a las que se les aplicó un tratamiento de P (45mg/Kg; s.c.) durante 5 días previo a la inducción de SAG (**Progesterona Crónica**), C: ratas a las que una vez inducido el SAG, se les aplicó única dosis de P (45mg/Kg; s.c., **Progesterona Aguda**). (Cx S: corteza somatomotora, Der: derecha/instilada; Izq: izquierda/contralateral).

Nosotros utilizamos otra variable de análisis, el número de complejos espiga-onda como expresión del SAG en forma de hiperexcitabilidad.

Se cuantificaron el número de complejos espiga-onda de alta amplitud y frecuencia que aparecen tras la inducción del SAG. En la Fig. 11, se muestran trazos electroencefalográficos representativos de la condición control, del día de inducción del SAG (día 0) y de los días 1 y 5 de seguimiento del hemisferio instilado de los tres grupos: A) SAG, B) Progesterona Crónica previa al SAG y C) Progesterona Aguda posterior al SAG. Se identificó que el día de inducción (0) en los tres grupos (A,B,C) existe una característica común, la aparición de complejos espiga-onda. Nótese que a partir del día 1 en el grupo de P Crónica ya no aparecen complejos espiga-onda, el efecto de la P crónica es evidente.

Mediante la cuantificación del número de complejos espiga-onda, identificamos que en el hemisferio instilado se manifestaron en el día de inducción (0) 2198.5 ± 813 , 1130 ± 2 y 1381.6 ± 814.2 complejos espiga-onda en los tres grupos: SAG (círculos negros), P Crónica (círculos azules) y P Aguda (triángulos naranjas) respectivamente. De esta manera es importante señalar que la aplicación de P Crónica o P Aguda disminuyeron en un 48.4% y 36.9% ($p \leq 0.001$) el número de complejos espiga-onda durante el día de inducción en comparación al grupo SAG.

La Aplicación aguda y crónica de Progesterona disminuyen la aparición de complejos espiga-onda del SAG

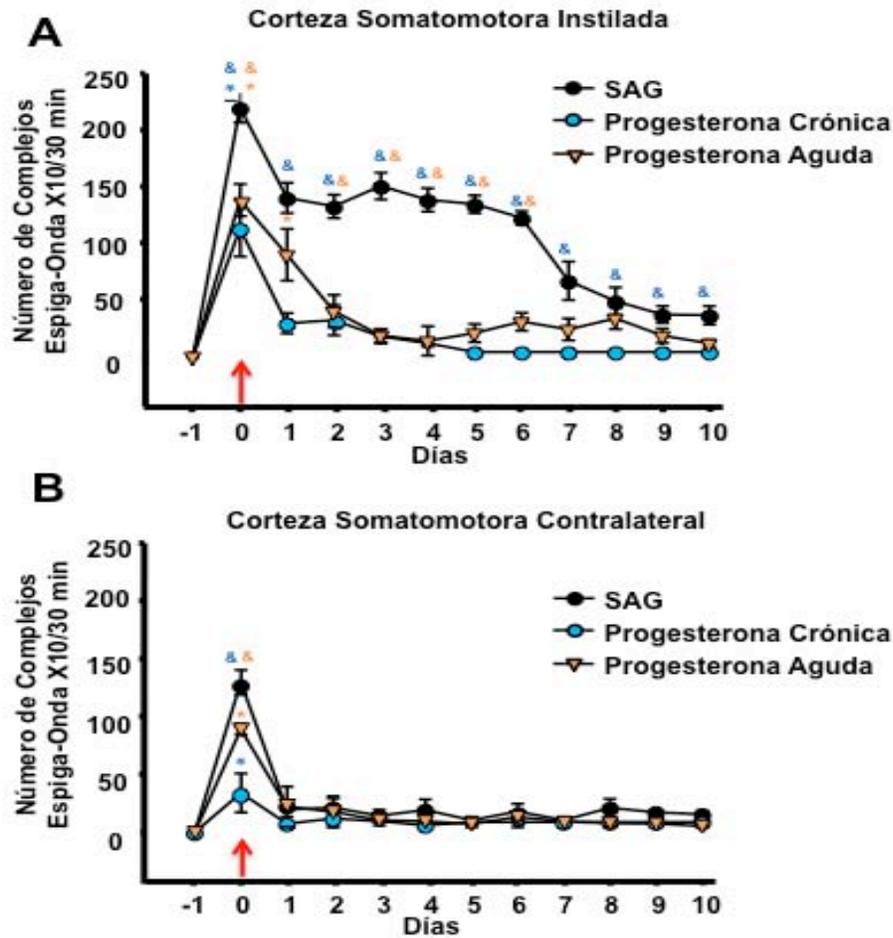


Figura 12. El número de complejos espiga-onda disminuye significativamente después de la aplicación de progesterona, análisis gráfico. En **A** la Cx somatomotora instilada y en **B** la Cx contralateral. Grupos, **SAG**: animales con SAG (círculos negros, ●; n=8); **Progesterona Crónica**: grupo al que se le aplicó un tratamiento de P (45mg/Kg; s.c.) durante 5 días previo a la inducción de SAG (círculos azules, ●; n=8); **Progesterona Aguda**: ratas a las que una vez inducido el SAG, se les administró una dosis de P (45mg/Kg; s.c.; triángulos naranjas, ▼, n=8). Inducción del SAG indicado con una flecha roja. ANOVA Post Hoc Tukey (*p≤0.001 intra grupos, & p≤0.001 entre grupos).

En el día 1 del SAG, solo la aplicación de P Crónica disminuyó significativamente ($p \leq 0.001$) el promedio de complejos espiga-onda del SAG (1402 ± 813) a 292 ± 90 lo que corresponde a un 79.2% de la hiperexcitabilidad. La P Aguda no disminuyó este índice (Fig.12), sin embargo a partir del día 2 y hasta el día 6, ambos tratamientos sí disminuyeron la hiperexcitabilidad de la abstinencia a GABA ($p \leq 0.001$). Llama la atención que el grupo de la P Aguda no muestra diferencias significativas con el grupo SAG a partir de los días 7-10. La ventana de protección de la P aguda es de los días 2-6, a partir del día 7 se observa hiperexcitabilidad. El efecto de la administración de P aguda sobre el SAG, es una analogía heurística, la irregularidad en la potencia del SAG también se ve reflejada en la aparición de complejos espiga-onda.

Al realizar un análisis cuantitativo del número de complejos espiga-onda en el hemisferio contralateral de la inducción del SAG (0). En el grupo SAG se cuantificaron 1292 ± 105 complejos espiga-onda; en el grupo con el tratamiento de P Crónica este número disminuyó a 341.5 ± 167 lo que representa una reducción del 73%. En el grupo de P Aguda se cuantificaron 887.9 ± 42.0 complejos, lo cual corresponde al 31% de reducción. No hay diferencias significativas en los tres grupos en la evolución del SAG a partir del día 1, lo cual indica que la aplicación de P crónica o aguda disminuye la propagación de la hiperexcitabilidad neuronal del SAG.

Esta serie de experimentos indican 1) la aplicación crónica de progesterona, previa a la inducción GABA, disminuye de forma significativa la hiperexcitabilidad y duración del SAG; y 2) la administración aguda de P disminuye la propagación e induce una evolución irregular del SAG.

Efecto de la aplicación de HEPP y CF₃HEPP en el EEG

Estudios previos indican que el SAG es refractario a diversos antiepilépticos (Brailowsky *et al.*, 1996), sólo la aplicación de HEPP durante la fase temprana del SAG disminuyó de forma paulatina la hiperexcitabilidad del fenómeno. No se conoce el efecto electrofisiológico de la administración de este fármaco por lo que decidimos estudiar su efecto sobre la potencia del EEG de la corteza somatomotora. El objetivo del siguiente grupo de trabajo fue determinar si la aplicación de una dosis de HEPP (50mg/Kg; i.p.) o de su análogo más potente, el CF₃HEPP (10mg/Kg; i.p.) modifican la expresión del SAG.

En la Fig. 13 se presentan los trazos representativos EEG y su análisis de Wavelets, y la actividad de ambos hemisferios cerebrales de un registro basal (A), el registro de 30 minutos después de la administración de HEPP (B) y finalmente, el de un animal al que se le aplicó una dosis de CF₃HEPP (C).

El registro control presentó actividad rápida y de baja amplitud, con un promedio de $400 \pm 0.8 \mu V^2/Hz$ en el hemisferio cerebral derecho y $339 \pm 0.8 \mu V^2/Hz$ en el izquierdo como en todos los

registros control realizados en esta tesis. Esta actividad se representa gráficamente en colores verdes-azules (Fig.13).

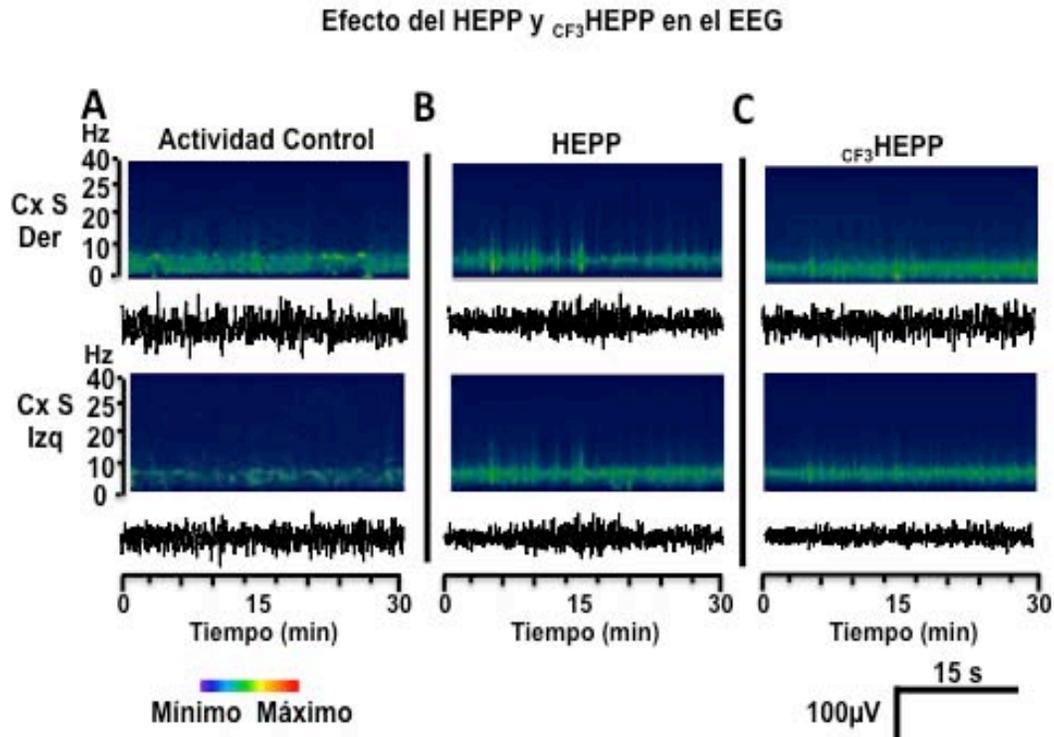


Figura 13. Efecto del HEPP y CF_3 HEPP en los espectros de frecuencia y registros EEG representativos de ambos hemisferios En **A**, se muestra el espectro y trazo EEG de la actividad cortical control de un animal (**Control**), mientras que **B** corresponde a los trazos de un animal al que se le aplicó una dosis de HEPP (50mg/Kg; i.p.). En **C** se presenta el espectro de frecuencia y trazo EEG representativo de un animal al que se le se aplicó una dosis de CF_3 HEPP (10mg/Kg; i.p.). Nótese que menor actividad cortical se presenta en color verde-azul.

La aplicación del HEPP o de su análogo más potente CF_3HEPP incrementa la potencia total del EEG. En los paneles B y C (Fig. 13) se observa por el análisis de Wavelets, el aumento potencia en la banda de frecuencia 4-7Hz, representado por ... aparición de color amarillo.

La administración de HEPP aumentó la potencia del EEG en 24% transitoriamente (Fig. 14-A, barra blanca) a $496.2 \pm 1.2 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ significativamente en el hemisferio derecho (Fig. 14-A, barra morada, $p \leq 0.01$). En el hemisferio cerebral contralateral también se cuantificó un incremento moderado pero significativo en la potencia (Fig.14-B, $p \leq 0.01$). La potencia promedio del EEG por la aplicación del HEPP fue de $351.1 \pm 0.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en comparación al control ($339 \pm 0.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$).

La aplicación de CF_3HEPP disminuyó transitoriamente la potencia a $387.5 \pm 0.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio derecho y a $324.9 \pm 0.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el izquierdo a comparación del control (Fig.14-A, barra verde, $p \leq 0.01$), lo cual se traduce a una disminución de 3.25% y 4.42% respectivamente.

Estos experimentos muestran por primera vez el análisis de la aplicación de ambos fármacos y su efecto EEG. Ambos modifican la actividad del electroencefalograma pero lo hacen de distinta forma, en tanto que el HEPP aumenta la actividad, el CF_3HEPP la disminuye.

La Aplicación de HEPP y CF_3 HEPP modifican la potencia del EEG

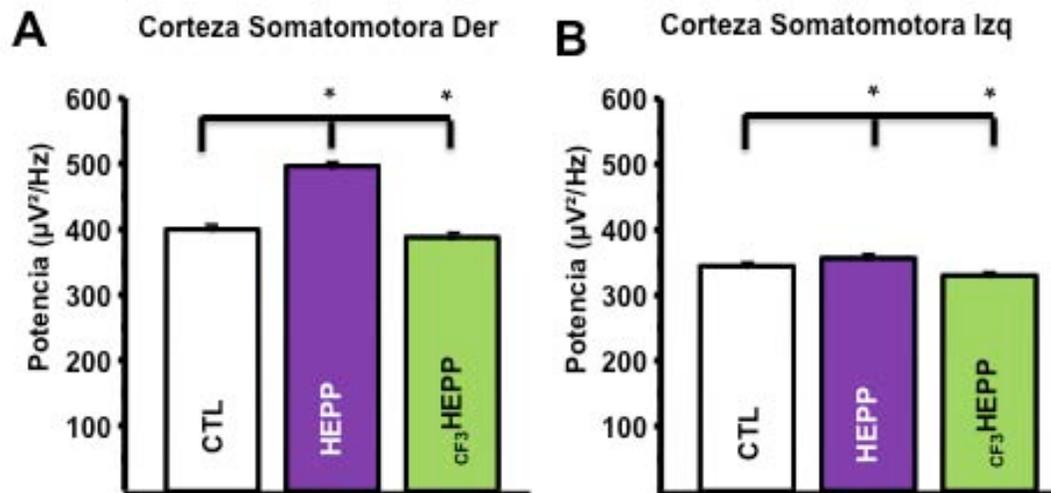


Figura 14. Una aplicación de HEPP y CF_3 HEPP modifican la potencia del EEG, análisis cuantitativo del espectro de frecuencia (4-20 Hz/30 min) en ambos hemisferios cerebrales. En **A** se grafica la Cx somatomotora derecha y en **B** la Cx contralateral. Nótese que la aplicación de una dosis de HEPP aumenta la potencia del EEG. Grupos, **Control:** actividad EEG basal (barras blancas, n=8), **HEPP:** grupo al que les aplicó una dosis de HEPP (barras moradas, 50 mg/Kg; i.p., n=8), **CF_3 HEPP:** ratas a las que se les aplicó una dosis de CF_3 HEPP (barras verdes, 10mg/Kg; i.p., n=8). Media \pm Error Estándar (EE). ANOVA Post Hoc Tukey (*p \leq 0.01).

La aplicación de HEPP y CF_3 HEPP disminuyen el SAG

El objetivo de esta serie de experimentos fue cuantificar si la administración de HEPP (50mg/Kg; i.p.) o su análogo más potente, el CF_3 HEPP (10mg/Kg; i.p.) pueden disminuir la potencia y número de complejos espiga-onda del SAG.

Los resultados se encuentran resumidos en la Fig. 15. El análisis de la frecuencia de 4-20 Hz mostró una actividad basal con predominio de ondas rápidas de pequeña amplitud, representada en el análisis de Wavelets con colores verdes-azules en la banda de frecuencia de 4-7Hz (A, Actividad Control). En B, se aprecia el aumento de la potencia en la banda de 4-20Hz por la aparición de tonos rojos del SAG. En C es notorio que después de la aplicación del HEPP, la hiperexcitabilidad neuronal cortical inducida por el SAG disminuye. Esto se representa gráficamente por el regreso inmediato de tonos verdes-azules, característicos de baja potencia. En D, es notoria la reducción de la hiperexcitabilidad neuronal del SAG posterior a la administración de CF_3 HEPP, lo cual se observa por la presencia de un EEG semejante al control.

El análisis cuantitativo de los datos anteriores se grafican en la Fig. 16. La aplicación de HEPP (barras moradas) y CF_3 HEPP (barras verdes) disminuyen significativamente la potencia promedio del SAG del hemisferio instilado (Fig. 16-A, barras negras). El HEPP disminuye en un 32% la actividad epileptiforme del SAG ($1142.1 \pm 5.2 \mu V^2/Hz$) a un promedio de $767.6 \pm 2.5 \mu V^2/Hz$. En contraste el CF_3 HEPP es más potente y reduce el promedio a $539.8 \pm 2.1 \mu V^2/Hz$, lo que corresponde a un 52%.

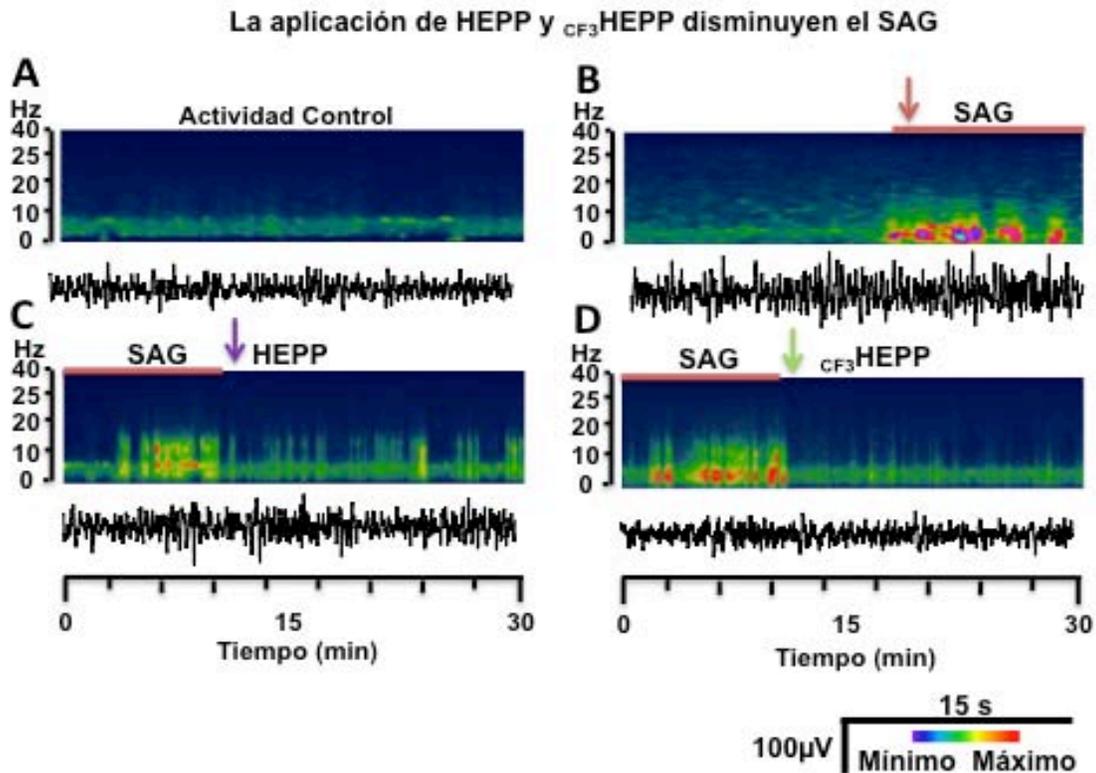


Figura 15. La administración de HEPP y CF_3 HEPP disminuye la expresión electrofisiológica del SAG, espectros de frecuencia y registros EEG representativos de la Cx Somatomotora Instilada. En **A**, se muestra el espectro y trazo EEG de la actividad cortical control de un animal; **B** corresponde a los trazos de un animal al que se le indujo SAG. En **C** se exhibe el espectro de frecuencia y trazo EEG de un animal al que se le indujo SAG y posteriormente se aplicó una dosis de HEPP (50mg/Kg; i.p.). Finalmente, **D** muestra un espectro y trazo EEG representativo de un animal al que se le indujo SAG y de forma posterior se aplicó una dosis de CF_3 HEPP (10mg/Kg; i.p.). Es de notarse el importante efecto en la disminución de la actividad epileptiforme de SAG. El aumento en la potencia se refleja en la aparición de color rojo, mientras que en menor actividad cortical predomina el color verde-azul.

En el hemisferio cerebral contralateral también se cuantificó una importante disminución en la hiperexcitabilidad del fenómeno, la potencia del SAG (Fig. 16-B, barra negra, $909.13 \pm 4.51 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$) disminuye en 41.9% posterior a la aplicación de HEPP (barra morada, $528.1 \pm 1.5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, $p \leq 0.001$). El CF_3HEPP disminuye la potencia en 56.3% (barra verde, $397.7 \pm 0.6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, $p \leq 0.001$).

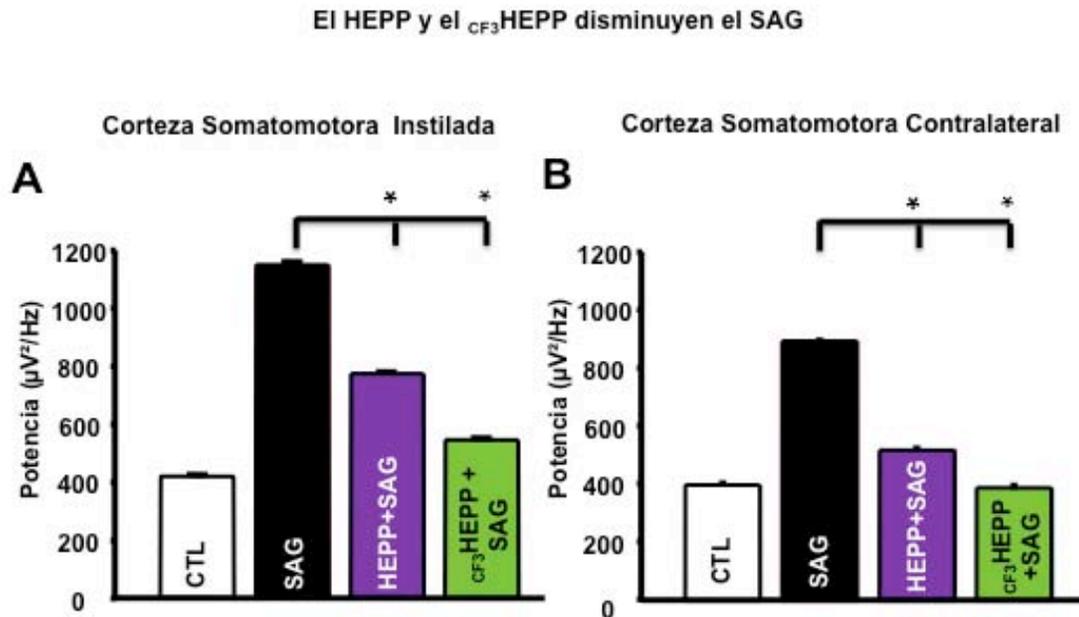


Figura 16. La aplicación de HEPP y de CF_3HEPP disminuyen significativamente la expresión electrofisiológica que caracteriza al SAG. En **A** la Cx somatomotora instilada y en **B** la Cx contralateral. Grupos: **CTL**: actividad EEG basal (barras blancas, $n=8$), **SAG**: animales a los que se les indujo SAG (barras negras; $n=8$); **HEPP+SAG**: ratas a las que se les indujo SAG y una hora después se les aplicó HEPP (50mg/Kg; i.p., barras moradas, $n=8$), **$\text{CF}_3\text{HEPP} + \text{SAG}$** : grupo al que una vez inducido el SAG, se les aplicó 1 dosis de CF_3HEPP (10mg/Kg; i.p., barras verdes, $n=8$). ANOVA Post Hoc Tukey ($*p \leq 0.001$).

El HEPP y CF_3HEPP disminuyen la actividad espiga-onda significativamente. La disminución en el número de complejos espiga-onda del SAG, por el efecto de la administración del HEPP y CF_3HEPP , en ambos hemisferios es evidente y significativa.

El promedio del número de complejos espiga-onda el día de inducción del SAG en el hemisferio instilado fue de 2242.5 ± 98.2 (Fig.17-A, barra negra), este número disminuyó 73.8% por la aplicación de HEPP (barra morada, 587.6 ± 92 , $p \leq 0.001$). La disminución de la actividad epileptiforme fue mayor por la administración del CF_3HEPP , su promedio de complejos espiga-onda fue de 112.9 ± 34 (barra verde, $p \leq 0.001$) lo que corresponde a 95% de reducción de la actividad. El SAG en el día de inducción tiene una gran actividad electrofisiológica epiléptica, la cual corresponde a 1.2 espigas por segundo. La aplicación de HEPP disminuye este valor a 0.33 espigas por segundo. Pero en orden de potencia, el que más disminuye esta actividad es el CF_3HEPP , cuya aplicación la disminuye a 0.06 espigas por segundo (Tabla 2).

Tabla 2. Número de Espigas/Segundo de los grupos experimentales

Grupo Experimental	Número de Espigas/Segundo
SAG	1.24
Progesterona Aguda + SAG	0.76
HEPP + SAG	0.32
CF_3HEPP + SAG	0.06

En relación a la propagación de la actividad epileptiforme, en el hemisferio cerebral contralateral el promedio de complejos espiga-onda durante el SAG fue de 833.8 ± 97.1 (Fig. 17-B, barra negra), esta actividad también se disminuyó significativamente (69.8%, $p \leq 0.001$) por la administración de HEPP (barra morada, 251.6 ± 95.3) y en 92.3% por la aplicación de ${}_{CF_3}$ HEPP (barra verde, 64.9 ± 18). Es importante notar que ambos fármacos disminuyeron la propagación en el hemisferio contralateral.

El HEPP y el ${}_{CF_3}$ HEPP disminuyen la expresión epileptiforme del SAG

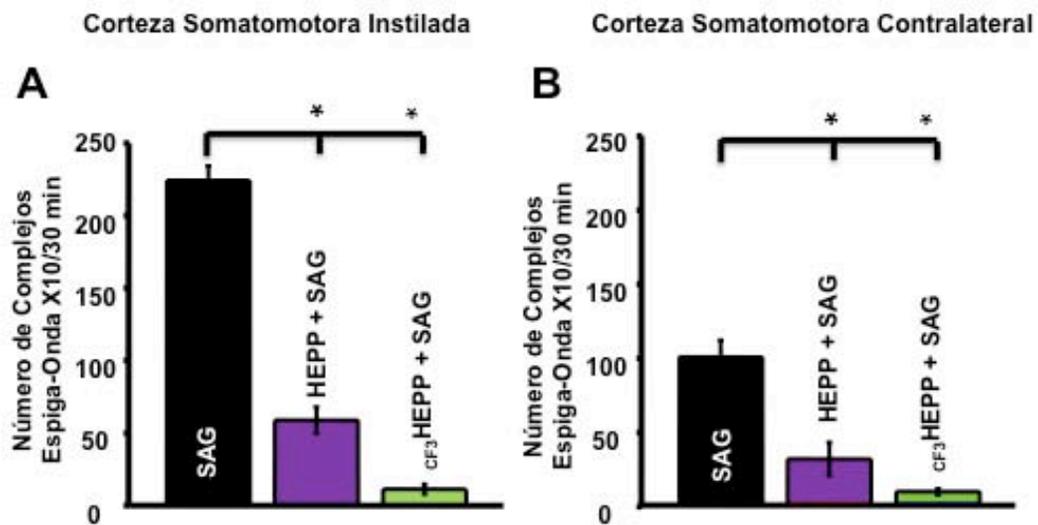


Figura 17. El número de complejos espiga-onda del SAG son disminuidos significativamente por la aplicación de HEPP y del ${}_{CF_3}$ HEPP. En A la Cx somatomotora instilada y en B la Cx contralateral. Grupos: SAG: grupo al que se le indujo SAG (barras negras; n=8); HEPP+SAG: animales a los que se les indujo SAG y una hora después se les aplicó HEPP (50mg/Kg; i.p., barras moradas, n=8), ${}_{CF_3}$ HEPP+SAG: ratas a las que una vez inducido el SAG, se les aplicó 1 dosis de ${}_{CF_3}$ HEPP (10mg/Kg; i.p., barras verdes, n=8). ANOVA Post Hoc Tukey (* $p \leq 0.001$).

Los resultados que arrojan estos experimentos indicaron: 1) la aplicación de HEPP y CF_3HEPP disminuyen significativamente la hiperexcitabilidad del SAG y el número de complejos espiga-onda en ambos hemisferios cerebrales; 2) de los fármacos utilizados en esta tesis, el CF_3HEPP en orden de potencia, es el más efectivo para disminuir la actividad epileptiforme del SAG.

Medición de la Ansiedad en el Estadio Inicial del SAG

El LEC es una prueba cuantitativa para la medición de la ansiedad en roedores, en la presente tesis fue utilizado para evaluar la conducta de ansiedad que acompaña a la abstinencia a GABA en los primeros estadios. Se obtuvo el porcentaje del tiempo de permanencia en los BC y los BA; así como, el número de entradas en cada uno de los brazos. La interpretación resulta sencilla, si el animal permanece más tiempo en los BC, se considera un dato de ansiedad.

Investigaciones previas señalan que el retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA induce un perfil tipo ansioso en la rata (Pimentel, 2013). Uno de los objetivos de esta tesis fue el de cuantificar si la administración de los fármacos disminuiría el perfil tipo ansioso que caracteriza al SAG.

La administración de Progesterona, HEPP y de CF_3 HEPP no modifican el perfil tipo ansioso que induce el SAG

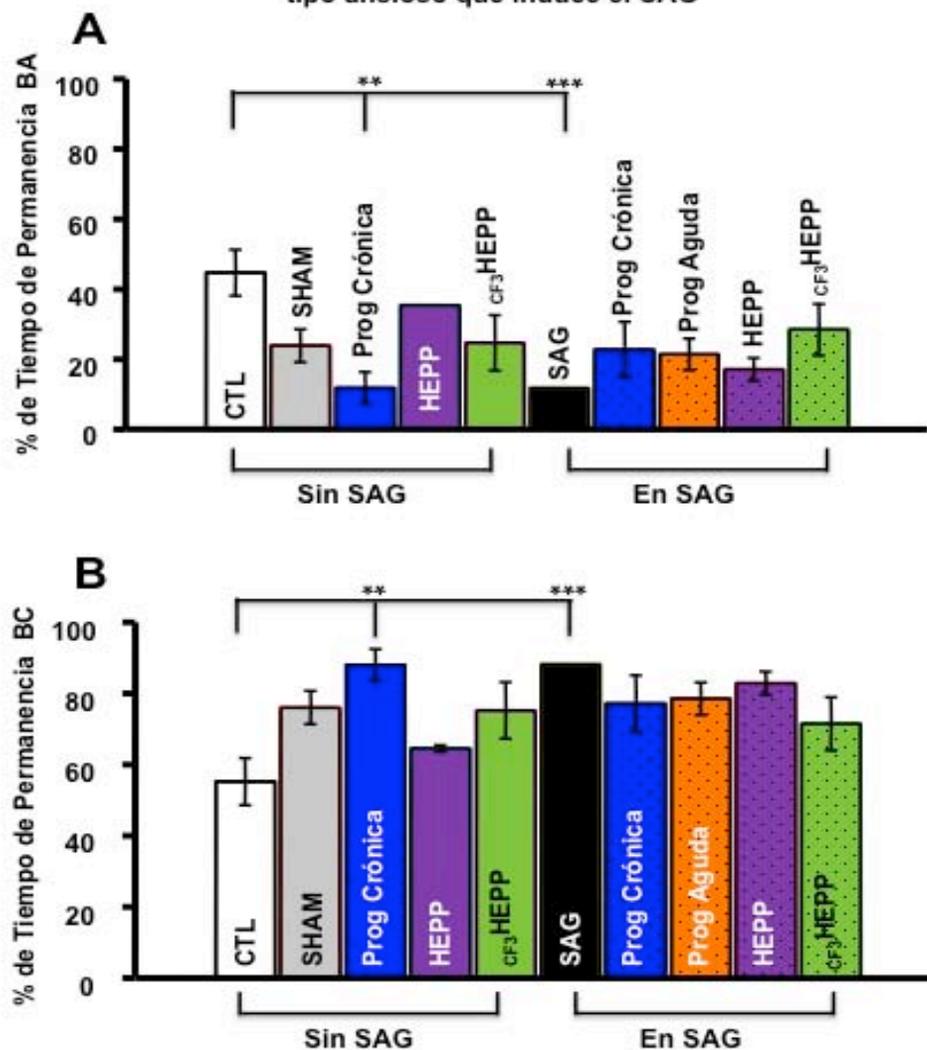


Figura 18. La aplicación de 5 días de P, induce un perfil tipo ansioso en la rata. En esta prueba, mayor tiempo de permanencia en BC asociado con menor tiempo en BA indica un perfil tipo ansioso. En **A** se gráfica el porcentaje de tiempo de permanencia en BA y en **B** el tiempo de permanencia en BC. La aplicación de P durante 5 días y la inducción de SAG, inducen un perfil tipo ansioso en la rata. No hay diferencias significativas en el resto de los grupos. ANOVA Post Hoc Tukey (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.01$).

Los resultados confirmaron que el SAG induce un perfil tipo ansioso en la rata. Lo cual se observa en el porcentaje de tiempo de permanencia en BA (Fig. 18-A, barras negras, 11.7 ± 3.2 , $p \leq 0.001$) y BC (Fig. 18-B, 88.2 ± 3.2 , $p \leq 0.001$) en comparación al grupo Control (Fig. 18, A-B, barras blancas, BA: 44.7 ± 6.5 , BC: 55.2 ± 6.5). También la aplicación del tratamiento de 5 días de progesterona (45mg/Kg; s.c.) induce un perfil tipo ansioso en la rata, lo cual se cuantifica en el tiempo de permanencia en BC (Fig. 18-B, barras azules, 88.02 ± 4.5 , $p \leq 0.01$) y BA (Fig. 15-A, 11.88 ± 4.49 , $p \leq 0.001$) en relación al grupo Control.

En el resto de los grupos, el porcentaje de tiempo permanencia en brazos cerrados y abiertos, y en el número de entradas, no se presentan diferencias significativas (Fig. 18-19).

Los resultados que arrojaron esta serie de experimentos fueron: 1) se confirmó que la inducción del SAG en la rata macho genera un perfil tipo ansioso. 2) Asimismo la administración del tratamiento de 5 días de progesterona genera un perfil tipo ansioso en la rata macho y 3) la progesterona, HEPP o CF_3HEPP no modifican el perfil tipo ansioso que induce la abstinencia a GABA.

La administración de Progesterona, HEPP y de CF_3 HEPP no modifican el perfil tipo ansioso que induce el SAG

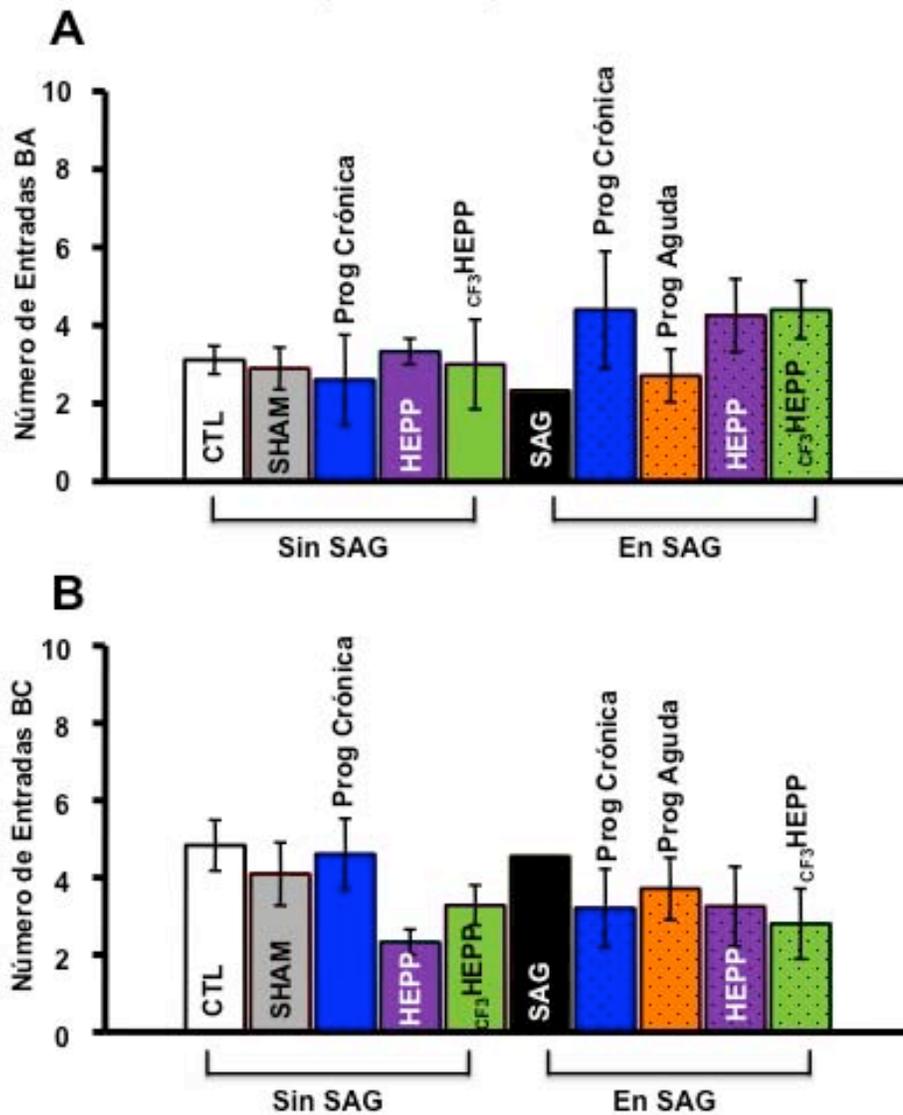


Figura 19. No hay diferencias significativas en el número de entradas a BC ni BA. En B y C se gráfica el número de entradas a BA y en B el número de entradas a BC. No hay diferencias significativas en los grupos. ANOVA Post Hoc Tukey.

VI. Discusión

Generalidades

Los resultados de la presente tesis muestran que la administración de progesterona, HEPP y CF_3HEPP disminuyen la hiperexcitabilidad del Síndrome de Abstinencia a GABA pero no modifican el perfil tipo ansioso que lo caracteriza. Se identificó que la administración de 5 días de progesterona aumenta la potencia del EEG pero no genera la aparición de abstinencia. La administración previa de progesterona a la inducción del SAG es más efectiva para disminuir la actividad epileptiforme del SAG en ambos hemisferios, en contraste, la administración de una dosis de progesterona una vez inducida la abstinencia, solo disminuye la potencia y número de complejos espiga-onda en el hemisferio no instilado. Por primera vez se cuantificó que la administración de una dosis de HEPP o CF_3HEPP modifican la potencia del EEG y en relación a los efectos de la progesterona crónica, el CF_3HEPP es el fármaco más potente para disminuir la actividad epileptiforme del SAG.

Análisis espectral de Wavelets durante el SAG

No obstante el análisis de dominio de frecuencia por medio de la transformada de Fourier obtiene una serie de números que representan a los componentes de la frecuencia, la colección de datos electrofisiológicos de esta tesis tiene el inconveniente metodológico de que las características estadísticas de la señal deben ser las mismas en cualquier punto, lo que hace al análisis de

Fourier excelente para evaluar una señal estacionaria en términos de su distribución de amplitud en un determinado momento.

El EEG de una crisis convulsiva o de una hiperexcitabilidad neuronal no es estacionario, existen eventos transitorios como complejos espiga-onda y descargas de potenciales sinápticos poblacionales que son estocásticos, es decir, no están sincronizadas como el registro EEG que se obtiene en condiciones control (Fernández-Más *et al.*, 1998). Esta es la razón por la que se utilizó el análisis de frecuencia de Wavelets para analizar la señal electrofisiológica del SAG.

El análisis de Wavelets puede describir espectralmente un fenómeno eléctrico sincrónico o con cambios en su frecuencia sin importar sus características estadísticas, este método representa a la mejor herramienta matemática para el análisis espectral de eventos estacionarios y transitorios. Un incremento en la actividad (amplitud) lo transforma en colores cálidos (rojo-naranja) y en contraparte, su reducción se cuantifica con colores fríos como verdes-azules. En esta tesis identificamos que la actividad control de los animales en vigilia, se encontraba en una banda de frecuencia de 4 a 10 $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$, lo cual ha sido ampliamente descrito en el campo de las neurociencias. Asimismo, se identificó que la hiperexcitabilidad neuronal que genera un incremento en la potencia de la actividad electroencefalográfica, se traduce en colores amarillo-rojos que corresponden a bandas de frecuencias de 4-15 Hz; presentándose durante la hiperexcitabilidad 1.2 espigas/seg. En esta tesis se

corroborar que el SAG tiene semejantes características electrofisiológicas a las que previamente se le han descrito.

Neurobiología de los cambios del SAG

Datos previos de nuestra línea de investigación indican que el SAG inducido con la misma concentración (5 mM) y velocidad de instilación (3 μ l/h durante 2h), genera hiperexcitabilidad de la corteza cerebral instilada con una duración de 9-10 días (Pimentel, 2013).

La inducción del SAG genera varios cambios en ambos componentes de la sinapsis. En los estadios tempranos, en la membrana presináptica disminuye la síntesis y la liberación de GABA de la hiperexcitabilidad neuronal y en consecuencia, la cantidad de GABA es hasta dos veces menor que en condiciones control (Salazar, 1994). En el componente postsináptico existe una disminución en el número de receptores GABA_A asociado a cambios en la expresión de subunidades del receptor ionotrópico, como lo son los cambios en la expresión de la subunidad α que reducen significativamente la sensibilidad farmacológica del receptor (Brailowsky *et al.*, 1988; Will *et al.*, 1988).

La fenomenología de la inducción del SAG indica que primero son los cambios en la neurotransmisión GABAérgica y posteriormente se instalan modificaciones en otro tipo de neurotransmisiones (Brailowsky, 1991; Calixto 2012); es decir, la actividad epileptiforme (complejos espiga-onda) que se observa en el EEG después de la interrupción de la infusión de GABA depende de

una modificación de la actividad sináptica que se inicia por la disminución del tono GABAérgico al cual gradualmente se agrega el incremento de la actividad de los receptores a glutamato (NMDA y AMPA), asociado al aumento del tono colinérgico y adrenérgico, sin modificaciones en la actividad serotoninérgica, así como cambios en la sensibilidad de algunos canales iónicos sensibles a voltaje como los canales de Ca^{2+} tipo L. Si bien la ventana temporal de los sucesos sináptico-moleculares son difíciles de indicar, nuestra línea investigación muestra que en las primeras 24 horas, el evento depende exclusivamente de los cambios de la neurotransmisión GABAérgica (Araneda *et al.*, 1994; Calixto 2012).

Datos previos indican que para el inicio del SAG es sumamente importante que las neuronas de la corteza somatomotora instilada, que a su vez son el foco de la descarga epiléptica, presenten un incremento en su actividad y en la concentración intracelular de Ca^{2+} asociado a una disminución de la corriente saliente de K^+ , favoreciendo un aumento del consumo de glucosa. En contra parte, la corteza que solo es instilada con el vehículo del GABA (solución salina) no presenta modificaciones en su EEG (Silva-Barrat *et al.*, 2005; Silva-Barrat *et al.*, 2001; Silva-Barrat *et al.*, 1995; Araneda *et al.*, 1994; Menini *et al.*, 1991).

Resulta importante indicar, que la corteza contralateral tiene un papel muy importante en la propagación de la actividad hiperexcitable. La interrupción abrupta de la instilación del aminoácido genera un foco epiléptico, pero la corteza contralateral

también se activa en forma importante y genera un mecanismo de reverberancia de comunicación neuronal que es posible identificar en el electroencefalograma. En esta tesis se identificó que no obstante que la instilación intracortical del hemisferio cerebral derecho es el inductor del foco epiléptico, la corteza contralateral tiene un papel importante en la modulación del SAG. De acuerdo al análisis matemático realizado en esta tesis, la actividad del hemisferio contralateral durante el SAG es sólo 25% menor que el hemisferio que inició la actividad epiléptica. Esta proporción es semejante desde la inducción hasta el día 8 de haberse interrumpido la instilación de GABA. Estos datos indican una importante propagación de la actividad epiléptica la cual no había sido considerada para su análisis e importancia en la actividad farmacológica de posibles sustancias antiepilépticas.

Amplitud y número de eventos espiga-onda en el SAG

La actividad del SAG es una actividad epileptiforme de gran amplitud en sus estadios iniciales, la potencia promedio reportado en esta tesis para el día de inducción del fenómeno fue de $959.3 \pm 2.1 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, semejante a lo previamente reportado en diferentes trabajos de nuestra línea investigación. Esta potencia corresponde al primer día del SAG, en la cual se cuantificaron 2198 ± 13 complejos espiga/onda en un período de 30 minutos; lo cual corresponde a 1.2 espigas/seg. Lo anterior es semejante en magnitud y frecuencia a cualquier tipo de epilepsia. Es muy claro que la excitabilidad disminuye en la evolución temporal. Se propone a la progesterona en

dos diferentes tratamientos así como al HEPP y al $_{CF_3}$ HEPP como futuros antiepilépticos. Enfocándose en el inicio del SAG pero no en sus mecanismos de mantenimiento, de ahí la importancia con la que se analiza el efecto de estas drogas en la primera etapa del SAG.

Efecto en el EEG de la aplicación de Progesterona durante 5 días

La progesterona es una hormona esteroide de 21 carbonos ampliamente estudiada por su actividad sobre el receptor $GABA_A$. Este neuroesteroide es un modulador alostérico positivo que incrementa el pegado del agonista a su receptor, incrementa la frecuencia y tipo de apertura del canal de Cl^- disminuye la actividad del receptor NMDA, incrementa la actividad de dopamina, disminuye la conductancia de Ca^{2+} y favorece la actividad colinérgica en el cerebro. Es decir, es un excelente neuromodulador de la excitabilidad neuronal.

Los datos indican que la aplicación de P durante 5 días es un tratamiento que modifica la actividad electroencefalográfica pero no genera abstinencia, la banda de frecuencia sobre la que aparece el aumento en la potencia se encuentra entre los 4-10 Hz (Fig. 7). Se identifica que estos cambios EEG son transitorios y que el incremento en la potencia de la actividad electroencefalográfica es por la aparición de ondas lentas de gran amplitud las cuales han sido identificadas en la aplicación aguda de diferentes agonistas $GABA$ érgicos como lo son las Bz y los barbitúricos. Con esto, se

demuestra que la aplicación de P no obstante a que modifica la actividad EEG, no induce un fenómeno de abstinencia. Datos previos de nuestro laboratorio indican que la misma dosis utilizada en esta tesis (45mg/Kg S.C.) pero administrada durante siete días sí es capaz de generar un potente síndrome de abstinencia. Es decir, que cinco días de tratamiento de P son capaces de modificar la neurotransmisión GABAérgica sin generar un incremento en la excitabilidad neuronal. Datos previos indican que algunos tratamientos farmacológicos de agonistas pueden modificar la expresión de receptores, por su relación con las proteínas, cambios en la expresión de segundos mensajeros que solos o en conjunto, son suficientemente fuertes para disminuir farmacológicamente el inicio de una abstinencia.

Evidencia en el campo de las neurociencias muestran que la P es capaz de generar síndromes de abstinencia como los que desarrollan las Bz y el alcohol (Khisti *et al.*, 2005; Kaufman *et al.*, 2010; Gonsalvez y Gallager, 1986; Ward *et al.*, 1998; Toki *et al.*, 1996). Por ejemplo, la epilepsia catamenial, en la cual la disminución abrupta de la concentración de P desarrolla 1) un incremento en la aparición de los episodios convulsivos así como 2) un aumento en su gravedad en la etapa estrogénica. En contraste, en la etapa progestacional hay disminución de ambos eventos; esto indica claramente como el fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal se reduce en presencia de P. Otros trastornos clínicos relacionados con la abstinencia a P son a) el trastorno ó disforia del síndrome

premenstrual y b) la depresión posparto. Ambos eventos indican claramente que la ausencia de P se asocia en forma proporcional a la aparición de ansiedad, irritabilidad, labilidad emocional y anhedonia (Reddy *et al.*, 2009; Quigg *et al.*, 2009; Zheng, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2000, Maguire *et al.*, 2009). Siendo el común denominador de estos trastornos el incremento crónico de los niveles plasmáticos de P y una súbita disminución.

Estos datos apoyan que la P puede disminuir la excitabilidad neuronal, pero también puede favorecer la aparición de focos epilépticos si los niveles plasmáticos de este esteroide disminuyen. Estos resultados coinciden con investigaciones previas que reportan que la administración conjunta de alopregnanolona con GABA, o la administración posterior del neuroesteroide, prolonga significativamente el SAG (Calixto *et al.*, 1995), es decir, una dosis de P una vez instaurada la abstinencia potencia la desensibilización del receptor, generando un incremento en la hiperexcitabilidad.

En esta tesis se identificó que la administración de P en forma crónica es un potente inhibidor de la actividad epiléptica un día después de haberse iniciado el SAG; el tratamiento cambia significativamente la potencia del EEG así como la aparición de descargas de complejos espiga onda, el día de inducción la hiperexcitabilidad que caracteriza al SAG se incrementa en un 4%, sin embargo, un día después de la inducción el proceso epileptiforme se reduce un 17%. En este contexto la duración del SAG se reduce un 50% en comparación a la abstinencia inducida por GABA. El

número de complejos espiga-onda que caracterizan a la actividad epileptiforme del SAG disminuye significativamente por el tratamiento crónico de progesterona en un 48%. Dada la ventana de tiempo, la farmacocinética y farmacodinamia de este esteroide, es posible que estos efectos se deban a una actividad genómica en el cerebro y no solamente a la actividad sobre el receptor GABA_A.

La P es rápidamente biotransformada por las neuronas y las células de la glía a un metabolito reducido de gran actividad sobre el receptor GABA_A, denominado alopregnanolona (AloP); diversas evidencias indican que la AloP es el neuroesteroide con mayor efecto sobre el mismo sustrato biológico que condiciona la aparición del incremento en la actividad neuronal (Balboa *et al*, 2006; Chisari *et al*, 2009, 2010; Hosie *et al*, 2006, 2008; Akk *et al*, 2004, 2005; 2010; Tsutsui *et al*, 2000; Lambert *et al*, 2009; Belelli *et al*, 2006). Sin embargo, es la AloP la que realizan los efectos no genómicos de la progesterona, por esta razón se propone que los resultados de este tratamiento crónico de P, no sean a través de AloP sino de la misma P que se involucró directamente sobre el material genómico de las neuronas y de las células gliales. Cambiando la actividad de la neurotransmisión GABAérgica y glutamatérgica, modificando con ello los mecanismos de inicio y mantenimiento del SAG.

En contraste a los efectos crónicos de P, se realizó la aplicación aguda de este NE y se evaluó de la misma forma sus efectos sobre la hiperexcitabilidad neuronal de SAG. La aplicación única de P una hora después de inducirse la abstinencia a GABA,

tuvo efectos electroencefalográficos tendientes a una disminución de la actividad epileptiforme del SAG, pero farmacológicamente no tan potentes como la administración crónica. Una sola dosis de P, disminuye alrededor de 4% al SAG el día de inducción sin modificar la duración de la abstinencia. Sin embargo, es capaz de disminuir la aparición de complejos espiga onda en un 36% el día de inducción del SAG.

En ambos tratamientos de P tanto el agudo como el crónico, llama la atención su efecto sobre el hemisferio cerebral contralateral (izquierdo) en relación al que inicia el proceso epiléptico (instilado con GABA, derecho). La propagación de la actividad del SAG se ve disminuida por la aplicación de P, siendo mayormente inhibido por el tratamiento crónico en relación al tratamiento agudo. Nosotros consideramos que este efecto sobre el hemisferio que proyecta la hiperexcitabilidad neuronal, que es responsable de la propagación y reverberancia de un foco epiléptico, es sumamente importante para ser considerado como antiepiléptico.

Esta tesis propone que el efecto agudo sea por una modulación directa sobre el receptor $GABA_A$ (actividad no genómica), contrastando con los efectos a largo plazo (genómicos) de la P. La dosis utilizada en los experimentos de esta tesis ha sido previamente validada por nuestro grupo de trabajo (Mejía, 2013). Se sugiere que el efecto de la aplicación aguda de P, al modular un receptor que se encuentra disminuido en su expresión o en su funcionalidad, está disminuida, por lo que se genera una pérdida en la eficiencia como

agonista alostérico, de esta manera la aplicación de P disminuyo su eficiencia farmacológica.

Ante estas evidencias, es posible pensar que una forma viable de disminuir la abstinencia que induce una droga GABAérgica es mediante la aplicación de otra que ocupe el mismo receptor.

La propuesta de este trabajo es que la P tiene efectos genómicos a mediano-largo plazo y que los efectos vistos por la administración crónica, previo a la instilación intracortical de GABA se debe a cambios en la expresión de subunidades del receptor, específicamente un cambio de la subunidad α_1 (down-regulation) por un incremento en la expresión de la subunidad α_4 en el espacio sináptico y un incremento en la expresión de la subunidad δ en el espacio extrasináptico, lo cual contribuye farmacológicamente a una disminución de la sensibilidad del receptor. En resumen estos efectos son: 1) cambio en la activación, 2) modificación de la fosforilación y 3) disminución del cambio conformacional del receptor en presencia del neurotransmisor (Maguire y Mody, 2009; Gangisetty *et al*, 2010; Maguire *et al*, 2009; Lawrence *et al*, 2010; Krishek *et al*, 1996; Mc Donald *et al*, 1998; Hosie *et al*, 2003).

El HEPP y el CF_3 HEPP son potentes inhibidores del SAG

El HEPP es un derivado de la fenil alquil amida, cuya estructura es altamente anticonvulsivante, entre sus propiedades que se conocen desde hace 50 años se encuentra su efecto altamente efectivo para las crisis de ausencia generalizadas. Ha sido previamente identificado que el HEPP tiene pocos efectos neurotóxicos y una potencia muy grande de inhibir las crisis inducidas por PTZ. Su concentración plasmática efectiva es de $50\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ y alcanza su dosis máxima a los 15 minutos después de haberse administrado, pero tiene una rápida eliminación del plasma (Gómez y Lehman, 1996). El HEPP se une a proteínas plasmáticas en un 40% lo cual indica una alta biodisponibilidad para sus efectos (García *et al.*, 1999).

El HEPP es el único medicamento que ha disminuido el SAG, datos previos indican que las descargas paroxísticas pueden disminuir significativamente apenas a los cinco minutos de haberse administrado vía intraperitoneal. Nuestra línea de investigación había mostrado previamente que el SAG es un modelo de epilepsia parcial refractario a la acción de medicamentos anti epilépticos en los estadios iniciales de la abstinencia, lo cual representaba un excelente modelo de estatus epiléptico o de epilepsia refractaria. Con los estudios de este medicamento, quedó demostrado que el HEPP es el único medicamento capaz de reducir la hiperexcitabilidad neuronal que ningún otro medicamento agonista de la neurotransmisión GABAérgica había logrado disminuir. Investigaciones farmacológicas

llegaron a la culminación de encontrar análogos más potentes que el HEPP en su función antiepiléptica, como es el caso de CF_3HEPP (Feria Velasco *et al.*, 1997).

La actividad antiepiléptica del HEPP es inmediata, su efecto además de disminuir la descarga epiléptica también contribuye a una disminución en la actividad del hemisferio contralateral activado, lo cual contribuye a inhibir el proceso de reverberación epiléptica que se observa en el SAG, lo anterior ha sido previamente estudiado por nuestra línea de investigación. La dosis utilizada en estos estudios ha sido de 50 mg/Kg de peso. Por primera vez en el campo de las neurociencias se publica que el análogo del HEPP, el CF_3HEPP es cinco veces más potente y que su efecto es prácticamente bloqueador de la expresión del SAG, lo que nunca había sido demostrado.

El mecanismo de acción de estos fármacos sugiere sea por una activación directa del receptor GABA_A , sin embargo no queda descartada la inhibición de la actividad glutamatérgica a través de su receptor NMDA. Lo anterior obedece a que los efectos anticonvulsivos tienen lugar durante las primeras horas de generación del SAG y no en sus fases tardías.

Los datos de la presente tesis muestran una diferencia significativa sobre la actividad EEG basal, en tanto que el HEPP incrementa la actividad, probablemente expensas de ondas lentas como lo hacen las benzodiazepinas, el CF_3HEPP disminuye la

actividad de la línea base del EEG. Esto sugiere un posible mecanismo distinto de la actividad de estos fármacos en el sistema nervioso central. Experimentos posteriores habrán de demostrar si esta premisa es correcta.

La dosis utilizada de CF_3HEPP fue de 10mg/Kg la cual es cinco veces menor del único fármaco que hasta ahora había disminuido al SAG, quedando de manifiesto una nueva caracterización de un fármaco con un gran potencial en el manejo de crisis convulsivas y capaz de reducir la hiperexcitabilidad neuronal de un fenómeno epiléptico. Esta es la primera vez que se reporta el potente efecto del CF_3HEPP .

La actividad epileptiforme del SAG muestra que es una actividad epiléptica de alta frecuencia (1.24 espigas/seg) como si se tratara de una crisis tónico-clónica generalizada; esta tesis demostró que el tratamiento con progesterona aguda reduce 61% la actividad del SAG en su expresión espiga-onda. En tanto que el tratamiento con progesterona crónica disminuye un 51% la hiperexcitabilidad neuronal del SAG, el tratamiento con HEPP lo disminuyó un 75%. Llama la atención que el CF_3HEPP aminoró hasta un 95% la expresión del SAG. De acuerdo a estos datos, en orden de potencia inhibitoria sobre la hiperexcitabilidad neuronal que caracteriza SAG, el CF_3HEPP es el fármaco más potente que se ha conocido sobre la inhibición de este modelo de epilepsia parcial.

No obstante a los potentes efectos antiepilépticos que han mostrado los diversos tratamientos utilizados en esta tesis, no tuvieron efecto sobre la actividad ansiogénica que se manifiesta en el SAG. El potente efecto del perfil antiepiléptico dista mucho de la eficiencia ansiolítica de estas drogas. Esto sugiere que el efecto de estos fármacos tiene prácticamente un efecto nulo sobre la actividad de la neurotransmisión serotoninérgica.

Un análisis de la información de estos últimos resultados, es que una droga con un potente efecto antiepiléptico no necesariamente tiene efectos ansiolíticos. Por lo tanto, la propuesta de esta tesis indica que el perfil de protección antiepiléptico, no revierte la ansiedad del síndrome.

Estos datos sugieren que el SAG inicia con un cambio en la liberación de GABA y en la expresión de sus receptores lo cual continúa con cambios en la expresión y funcionamiento de otras neurotransmisiones lo que sugiere un incremento en la actividad glutamatérgica y una disminución en la expresión serotoninérgica.

La propuesta de esta tesis es que una vez iniciados los cambios GABAérgicos, estos son un periodo crítico para la expresión de las siguientes modificaciones en diferentes sistemas de neurotransmisión. Por lo tanto los fármacos que tengan actividad pro GABAérgica no tienen efectos sobre la ansiedad.

VII. Conclusiones

1. La aplicación de un tratamiento de progesterona previo a la inducción del SAG, disminuye la hiperexcitabilidad y duración del síndrome en ambos hemisferios.
2. La aplicación aguda de progesterona sólo disminuye la propagación de la hiperexcitabilidad.
3. El HEPP y el CF_3HEPP disminuyen la potencia del EEG y el número de complejos espiga-onda del SAG.
4. En orden de potencia, el CF_3HEPP es el fármaco utilizado en esta tesis, más eficaz para disminuir la hiperexcitabilidad del SAG.
5. La progesterona, HEPP y el CF_3HEPP disminuyen la actividad epileptiforme pero ninguno de estos fármacos tiene efectos en el perfil tipo ansioso que induce la abstinencia a GABA.

VIII. Referencias

- Academia Nacional de Medicina (1999). Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1ª. edición en Español, Academia Nacional de Medicina. México (DF).
- Araneda, S., Silva-Barrat, C., Menini, C. y Naquet, R. (1994). High Expression of Noradrenaline, Choline Acetyltransferase and Glial Fibrillary Acid Protein in the Epileptic Focus Consecutive to GABA Withdrawal. An Immunocytochemical Study. *Brain Research*. 655(1-2): 135-146.
- Akk G, Bracamontes J. R, Covey D. F. (2004) Neuroactive steroids have multiple actions to potentiate GABA_A receptors. *J Physiol*. 558(1): 59-74.
- Akk G, Covey. D. F, Evers A. S, Mennerick S, Zorumski C. F, Steinbach J. H. (2010) Kinetic and structural determinants for GABA-A receptor potentiation by neuroactive steroids. *Current Neuropharmacology*. 8:18-25.
- Akk G, Shu H-J, Wang C, Steinbach J. H. (2005) Neurosteroid access to the GABA_A receptor. *The journal of neuroscience* 25(50): 11605-11613.
- Balboa R. C, Pinna G, Zhubi A, Maloku E. (2006) Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *J Neurosci* 39(103): 14602-14607.
- Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An., I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'Homme, J.F. et al. (2001). First genetic evidence of GABA_A receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the γ_2 subunit gene. *Nat Genet*. 28:46-48.

- Brailowsky, S. (1991). The GABA-Withdrawal Syndrome. *Proc West Pharmacol Soc*, 34: 227-228.
- Brailowsky, S. (2000). Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología. México: Fondo de Cultura Económica. 7-248.
- Brailowsky, S., Montiel, T., Hernández, E., Marescaux, C. y Vergnes, M. (1992). Effects of 3-hydroxy, 3-ethyl,3-phenylpropionamide (HEPP) on Rat Models of Generalized and Focal Epilepsy. *Epilepsy Research*, 11:167-172.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., Riche, D. y Naquet, R. (1988). The GABA-Withdrawal Syndrome: a New Model of Focal Epileptogenesis. *BrainResearch*, 442: 175-179.
- Brailowsky, S, Silva-Barrat C, Menini C, Riche D et al. (1989) Effects of localized, chronic GABA infusions into different cortical areas of the photosensitive baboon, Papio Paio. *Electroencephalographic Clin Neurophysiol*, 72: 174-156.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., et al. (1990) Electroencephalographic study of the GABA-Withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia*; 31: 369-377.
- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C. y Naquet, R. (1987). Epileptogenic Gamma-Aminobutyric Acid Withdrawal Syndrome after Chronic, Intracortical Infusion in Baboons. *Neuroscience Letters*, 74: 75-80.
- Brailowsky, S. y Montiel, T. (1996). Efectos de la DL-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP) sobre un nuevo modelo de status epilepticus

- focal: el síndrome de abstinencia al GABA (SAG). *Arch Neurocién.* 2:104-107.
- Belleli, D., Casula, A., Ling, A. y Lambert J.J. (2002). The influence of subunits composition on the interaction of neurosteroids with GABA_A receptors. *Neuropharmacology* 43: 651-661.
- Belleli, D. y Lambert, J.J. (2005). Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABA_A receptors. *Nature reviews/Neuroscience.* (6):565-575.
- Belleli D, Herd M. B, Mithcel E. A. (2006) Neuroactive steroids and inhibitory neurotransmission: mechanisms of action and physiological relevance. *Neuroscience.* 138: 821-829.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. y Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev.* 84:835-67.
- Brandon, C.D. y Fisher, J.L. (2006) Identification of structures within GABA_A receptor α subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:1094-101.
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B Receptors Subtypes. *TINS.* 11(3).
- Bowery, N. (1990). GABA Transporter Protein Cloned from de Rat Brain. *TIPS,* 11:435-437.
- Bowery, N.G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J.P., Marshall, F., Raiteri, .M., Bonner, T.L. y Enna, S.J. (2002). International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 54:247-264.

- Cabo de la Vega, C., Villanueva-Hernández, P. y Prieto-Martín, A. (2006) Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales, nuevas perspectivas. *Rev Neurol.* 42:159-168.
- Calixto, E., Montiel, T., Lemini, C. y Brailowsky, S. (1995). Allopregnanolone Potenciates a GABA-Withdrawal Syndrome in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience Letters*, 195:73-76.
- Calixto, E. (2012). La abstinencia a GABA: 20 años de un modelo hiperexcitabilidad neuronal. *Salud Mental.* 35:427-434.
- Calixto, E., López-Colomé, A.M., Casasola, C., Montiel, T., et al. (2000). Neocortical hyperexcitability alter GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Research*, 39:13-26.
- Carlson, N. (2006). Fisiología de la Conducta. México: Pearson, 120-140.
- Carvajal, G., Russek, M., Tapia, R. y Massieu, G. (1964). Anticonvulsive action of substances designed as inhibitors of γ -aminobutyric- α -ketoglutaric transaminase. *Biochem. Pharmacol.*, 13:1059-1069.
- Casasola, C., Bargas, J., Arias-Montaño, J.-A., Calixto, E., Montiel, T, Galarraga, E. y Brailowsky, S., (2002). Hippocampal Hyperexcitability Induced by GABA Withdrawal Syndrome is due to Down-Regulation of GABA Receptors. *Epilepsy Research*, 47:257-271.
- Chisari M, Eisenman L. N, Krishan K. (2009) The influence of neuroactive steroids lipophilicity on GABA A receptor modulation: Evidence for a low-affinity interaction. *J Neurophysiol.* 102: 1254-1264.
- Chisari M, Shu H-J, Taylor A, Steinbach J. H, Zorumski C. F, Mennerick S. (2010) Structurally diverse amphiphiles exhibit biphasic modulation of GABA_A receptors: similarities and differences with neurosteroids actions. *British journal of pharmacology.* 160: 130-141.

- Choi, D.W., Farb, D.H. y Fischback, G.F. (1977). Chlordiazepoxide selectively augments GABA action in spinal cord cell cultures. *Nature*. 269: 342-344.
- Choi, D.W., Farb, D.H. y Fischback, G.F. (1981). Chlordiazepoxide selectively potentiates GABA conductance of spinal cord and sensory neurons in cell culture. *J. Neurophysiol.* 45:624-631.
- Clement, Y. y Chapouthier, G. (1997). Biological Bases of Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 623-633.
- Compagnone, N. A., y Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.* 21: 1-56.
- Cortes-Romero, C., Galindo, F., Galicia-Isasmendi, S. y Flores, A. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol.* 52(11):655-675.
- Crestani, F., Lorez, M., Baer., K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J.P., et al. (1999). Decreased GABA_A -receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci* 2:833-839.
- Czlonkowska, A. I., Zienowicz, M., Bidzinski, A., Maciejak, P., Lehner, M., Taracha, E. Wislowska, A. y Plaznik, A. (2003). The role of Neurosteroids in the Anxiolytic, Antidepressive- and Anticonvulsive effects of Selective Reuptake Inhibitors. *Medical Science.* 9:270-275.
- Del Rio-Portilla, I., Ugalde, E., Juárez, J., Roldán, A. y Corsi-Cabrera, M. (1997). Sex Differences in EEG in Adult Gonadectomized Rats before and after Hormonal Treatment. *Psychoneuroendocrinology*, 22:627-642.
- Enna, S.J. (2001). GABA_B receptor signaling pathways. In Möhler, H. ed.

- Pharmacology of GABA and Glycine neurotransmission. *Berlin: Springer*; 2001. P.329-42.
- Enna, S.J. y Möhler, H. (2007). The GABA receptors. 3 ed. Totowa, N.J: *Human Press*;2007.
- Farrant, M. y Nusser, Z. (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* 6,215-229.
- Feria Velasco A, Martínez de Muñoz D, Rubio Donnadieu F. (1997). Epilepsia aspectos neurobiológicos, médicos y sociales. México: Primera edición. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- Fernández-Guasti, A. y Martínez-Mota, L. (2003). Orchidectomy Sensitizes Males Rats to the Action od Diazepam on Burying Behavior Latency: Role of Testosterone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75; 473-479.
- Fernández- Guasti, A. y Picazo, O. (1999). Sexual Differentiation Modifies the Allopregnanolone Anxiolytic Actions in Rats. *Psychoneuroendocrinology*, 24: 251-267.
- Fernández-Mas, R., Valdés, A., Martínez, A., Magdaleno, V., Almazán, S., Martínez, D. y Fernández-Guardiola, A. (1998). Visualización Gráfica de las Transiciones del Sueño en el Hombre: Métodos de Representación Tridimensional. *Salud Mental*, 6:27-32.
- Franks, N.P. y Lieb, W.R. (1994). Molecular and Cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. 367:607-14.
- Foley, C.M., Stanton, J.J., Prince, E.M., Cunningham, J.T., Hasser, E.M. y Heesch, C.M. (2003). GABA(A) alpha 1 and alpha 2 receptor subunit expresión in rostral ventrolateral medulla in nonpregnant and pregnant rats. *Brain Res.* 975:196-206

- Follesa, P., Biggio, F., Mancuso L., Cabra, S., et al. (2004). Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the α_2 subunit of the GABA_A and its prevention by diazepam or gamma-hydroxy butyric acid. *Brain Res Mol Brain Res.* 120: 130-137.
- Follesa, P., Mancuso, L. y Biggio, F. (2001). Diazepam during prior ethanol withdrawals does not alter seizure susceptibility during a subsequent withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav.* 68:339-346.
- Follesa, P., Serra, M., Cagetti, E., et al. (2000). Allopregnanolone synthesis in cerebellar granule cells: roles in regulation of GABA(A) receptor expression and function during progesterone treatment and withdrawal. *Mol Pharmacol.* 57:1262-1270.
- Foster, A. y Kemp, J. (2006). Glutamate and Gaba based CNS Therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6:7-17.
- Frye, C.a. y Reed, T.A.W. (1998). Androgenic Neurosteroids: Anti-Seizure Effects in an Animal Model of Epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*, 23:385-399.
- Frye, C.A. (1995). The Neurosteroid $3\alpha,5\alpha$ -HTP has Antiseizure and Possible Neuroprotective Effects in Animal Model of Epilepsy. *Brain Research*, 696:113-120.
- Gale, K. (1992). Role of GABA in the genesis of chemoconvulsant seizures. *Toxicol.Lett.*64:417-428.
- Gangisetty, O., Reddy, D. (2010). Neurosteroid withdrawal regulates GABA-A receptor α_4 -subunit expression and seizure susceptibility by activation of PR-independent EG3 pathway. *Neuroscience.* 170(3): 865–880.

- García, L.J., Medina, L. J. y Jung, H. (1999). Unión a proteínas plasmáticas de la DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP). Un nuevo anticonvulsivante. *Revista de la Sociedad Química de México*. 2:39-42.
- Gee, K.W. (1988). Steroid modulation of the GABA/benzodiazepine receptor-linked chloride ionophore. *Mol Neurobiol*. 2:291-317.
- Gloor, P., Hall, G. y Coceani, F. (1967). Differential epileptogenic action of penicillin on cortical and subcortical brain structures. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol*. 23:491.
- Goddard, A.W., Mason, G.F., Almai, A., Rothman, D.L., Behar, K.L., Petroff, O.A., Chamey, D.S. y Krystal, J.H. (2001). Reductions in occipital cortex GABA levels in panic disorder detected 1HMRS. *Arch Gen Psychiatry*. 58:556-561.
- Gómez, L.E. y Lehmann, F.P.A. (1996). Parámetros farmacocinéticos del anticonvulsivante DL-3-hidroxi, 3-etil, 3-fenil propionamida (HEPP) después de la administración intraperitoneal a ratas. *Arch Neurocienc*. 2:85-89.
- Gulinello, M., Gong, Q.H., Li, X. y Smith, S.S. (2001). Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha 4 GABA_A receptor subunits levels in association with increases anxiety in the female rat. *Brain Res*. 910:55-66.
- Gulinello, M., Orman, R. y Smith, S.S. (2003). Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the alpha 4 subunit of the GABA_A receptor in the amygdala after progesterone withdrawal. *Eur J Neurosci*. 17:641-648.

- Gunther, U., Benson, J., Bneke, D., Fritschy, J-M, Reyes, G. et al., (1995). Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeting disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92:7749-7753.
- Gutiérrez A. G, Contreras C. M, Meza J. L. (2000) Como actúa la P sobre el sistema nervioso central. *Salud Mental* 23(002):42-48.
- Gonsalves S. F. y Gallager D. W. (1986) Time course for development of anticonvulsant tolerance and GABAergic subsensitivity after chronic Dz. *Brain research.* 405:94-99.
- Harrison, N.L. y Simmonds, M.A. (1984). Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res.* 323: 287-292.
- Herd, M.B., Belleli, D. y Lambert, J.J. (2007). Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors. *Pharmacol Ther.* 116:20-34.
- Hernández, A. (2013). La hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia a GABA produce modificaciones conductuales en la rata hembra. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Hertz, L. (2013). The glutamate-glutamine (GABA) cycle: importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. *Frontiers in Endocrinology*, 4:1-16.
- Hosie. M. A, Dunne. E. L, Harvey R. J, Smart T. G. (2003) Zinc-mediated inhibition of GABAA receptors: discrete bindings sites underlie subtype specificity. *Nature neuroscience* 6(4): 362-369.

- Hosie, M. A., Megan, E. Wilkins, Helena, M. A. da Silva y Trevor, G. Smart. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABA-A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. 444:486-489.
- Hsu, F.F. y Smith, S.S. (2003). Progesterone withdrawal reduces paired-pulse inhibition in rat hippocampus: dependence on GABAA receptor alpha 4 subunit up-regulation. *J Neurophysiol*. 89:186-198.
- Javier A.M., Sánchez G. y Martínez de Muñoz. (1996). Espectro de acción antiepiléptica de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida y de sus homólogos inferiores. *Arch Neurocién (Méx)*. 1:76-80.
- Joshi, S., Rajasekaran, K. y Kapur, J. (2013). GABAergic transmission in temporal lobe epilepsy: The role of neurosteroids. *Experimental Neurology*. 244: 36-42.
- Juárez, J. y Corsi-Cabrera, M. (1995). Sex Differences in Interhemispheric Correlation and Spectral Power of EEG activity. *Brain Research Bulletin*, 38:149-151.
- Juárez, J. y Corsi-Cabrera, M. y Del Río-Portilla, I. (1995). Effects of Prenatal Testosterone Treatment on Sex Differences in the EEG Activity on the Rat. *Brain Research*, 694:21-28.
- Katsura, M., Shibasaki, M., Kurokawa, K., Tsujimura, A. y Ohkuma, S. (2007). Upregulation of L-type High Voltage-gated Calcium Channel Subunits by Sustained Exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in Cerebrocortical Neurons. *Journal of Andrology*, 29:524-532.
- Kalueff, A. y Nutt, D.J. (1997). Role of GABA in memory and anxiety. *Depress Anxiety* 4:100-110.

- Kaufman K. R, Tanchuck M. A, Strong M. N, Finn D. A. (2010) Replacement with GABAergic steroid precursors restores the acute ethanol withdrawal profile in ADX/GDX mice. *Neurosci.* 166(1): 1-18.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., et al. (1998). GABA_B receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature.* 396:683-687.
- Khisti R. T, Boyd K. N, Kumar S, Morrow A. L. (2005) Systemic ethanol administration elevates deoxycorticosterone levels and chronic ethanol attenuates this response. *Brain research.* 1049: 104-111.
- Klitgaard, H., Matagne, A., Gobert, J. y Wnlfert, E. (1998). Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 353:191-206.
- Krishek. B. J, Amato A, Connolly. C. N, Moss. S. J, Smart. T. G. (1996) Proton sensitivity of the GABA_A receptor is associated with the receptor subunit composition. *Journal of physiology* 492(2): 431-443.
- Krnjević, K. (1991). Significance of GABA in Brain Function. En:G. Tunnuclyff y B.U. Raess, (Eds.), *GABA Mechanism in Epilepsy.* (pp.47-87). New York: Wiley-Liss, Inc.
- Krnjević, K. (1984). Neurotransmitters in Cerebral Cortex: a General Account. En: E.G. Jones y A. Peter (Eds.), *Cerebral Cortex, Vol.2. Functional Properties of Cortical Cells.* (pp.39-61), New York: Plenum Press.
- Krnjević, K. & Schwartz, S. (1967). Some properties of unresponsive cells in the cerebral cortex. *Exp. Brain Res.* 3:306-319.
- Kubli-Garfias, C., Canchola, E., Arauz-Contreras, J., y Feria-Velazco, A. (1982). Depressant Effect of Androgens on the Cat Brain Electrical

- Activity and its Antagonism by Ruthenium Red. *Neuroscience*, 7:2777-2782.
- Lambert, J.J., Belleli, D., Hill-Venning, C. y Peters, J.A. (1995). Neurosteroids and GABA_A receptor function. *Trends Pharmacol Sci*. 16:295-303.
- Lambert, J.J., Belleli, D., Peden, D.R., Vardy, A.W. y Peters, J.A. (2003). Neurosteroids modulation of GABA_A receptors. *Prog Neurobiol* 71: 67-80.
- Lambert, J. L, Cooper, M.A. y Simmons, R. D. J. (2009). Neurosteroids: Endogenous allosteric modulators of GABA_A receptors. *Psychoneuroendo*. 34: 548-558.
- Lawrence C, Martin. B. S, Sun. C, Williamson. J, Kapur. J. (2010) Endogenous neurosteroid synthesis modulates seizure frequency. *Ann Neurol*. 67(5): 689-693.
- Lin, L.H., Chen, L.L., Zirrolli, J.A. y Harris, R.A. (1992). General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acid A receptors expressed by *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J.Pharmacol Exp Ther*. 263:569-78.
- Luscher, B., Shen, Q. y Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. 16:383-406.
- Maguire J, Ferando I, Simonsen C, Mody I. (2009) Excitability changes related to GABA_A receptor plasticity during pregnancy. *J. Neurosci*. 29(30): 9592-9601.
- Maguire J, Mody I. (2009) Steroid hormone fluctuation and GABA_A R plasticity. *Psychoneuroendo*. 34:S84-S90.

- Martín-García, E., Darbra, S., y Pallarés, M. (2007). Implicación de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica. Revisión en *Neurociencia*. 44 (11):661-676.
- McDonald. B. J, Amato. A, Connolly. C. N, Benke. D, Moss. S. J, Smart. T. G. (1998) Adjacent phosphorylation sites on GABAA receptor β subunits determine regulation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature neuroscience* 1(1): 23-28.
- Macdonald, R. y Barker, J.L. (1978). Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian neurons. *Nature*. 271:563-564.
- Macdonald, R. y Barker, J.L. (1979). Anticonvulsant and anesthetic barbiturates: different postsynaptic actions in cultured mammalian neurons. *Neurology*. 29:432-447.
- Mejía, P. (2013). *El Síndrome de Abstinencia a Progesterona (SAProg): Un nuevo modelo de inducción aguda de epileptogénesis focal*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Ciencias, UNAM, Ciudad de México, México.
- Melchior C.L., y Ritzmann, R.F. (1994). Pregnenolone an pregnenolona sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 48:893-897.
- Mendu, S.K., Bhandage, A. y Bryndis Birnir, Z. J. (2012) Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat t lymphocytes. *PLOS ONE*, 7, 8 1-11.
- Menini, C., Mraovitch, S., Calando, Y., De la Sayette, V., et al. (1991). Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of

- chronic intracortical GABA infusions in the rat. *Neuroscience*. 41:607-615.
- Meza, S.E., Zenteno, S., Juárez, E., Martínez de Muñoz, D. y Carvajal, G. (1990). A new homologous series of anticonvulsants: phenyl-alcohol-amides. Synthesis and pharmacological evaluation. *Arseim-Forsch/Drug Res*. 40: 1289-1291.
- Mienville, J.M. y Vicini, S. (1989). Pregnenolone sulfate antagonizes GABA_A receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res*. 489:190-194.
- Miguel, A. (2012). *Administración Crónica de Dz como Promotor de Conductas Adictivas a Drogas en la Edad Adulta de la Rata*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Möhler, H. (2002). Pathophysiological aspects of diversity in neuronal inhibition: a new benzodiazepine pharmacology. *Dialogues Clin Neurosci*. 4:261-269
- Möhler, H. (2006). GABA_A receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res*. 326:505-516.
- Möhler, H. (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62:42-53.
- Nelson, H., Mandiyan, S. y Nelson, N. (1990). Cloning of the Human Brain GABA Transporter. *FEEBS Lett* 269: 181-184.
- Nin, M.S. Salles, F.B. Azeredo, L.A., Frazon, A.P., Gomez, R. y Barros, H.M. (2008) Antidepressant effect and changes of GABA_A receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol*. 22: 477-485.

- Nutt, D.J. y Malizia, A.L. (2001). New insights into the role of the GABA_A receptor in psychiatric disorders. *Brit J. Psychiatry*. 179:390-396.
- O'Brian, C.P. (2005). Benzodiazepine use, abuse and dependence. *J Clin Psychiatry*, 66:28-33.
- Olmedo, R. y Hoffman, R.S. (2000) Withdrawal síndromes. *Emerg Med Clin North Am*. 18:273-288.
- Olsen, R. (2000). GABA is the Major Inhibitory Neurotransmitter in the Nervous System. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, 12: 159-168.
- Olsen, R.W. y Sieghart, W. (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*. 56: 141-148.
- Paxinos, G. y Watsonm, C. (1998). The rat btain in stereotaxic coordinates. Academic Press. 20-39.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. y Briley, M. (1985). Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci Methods*, 14: 149-167.
- Peng, Z., Huang, C.S., Stell, B.M., Mody, I. y Houser, C.R. (2004). Altered expression of the δ subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J.Neurosci*. 24:8629-8639.
- Pimentel, A.K. (2013). Evaluación de la conducta sexual, de ansiedad y de depresión durante el síndrome de abstinencia a GABA en la rata macho. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.

- Pritchett, D.B. Sontheimer, H., Shivers, B.D., Ymer, S., Kettenmann, H., et al. (1989) Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature*. 338:582-585.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O. y Williams, S.M. (2006). *Neurociencia*. México: Panamericana. Pp. 156-160.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O. y Williams, S.M. (2007). *Neuroscience*. Sinauer Associates: Sunderland, MA. Pp. 133-137.
- Quigg M, Smithson S. D, Fowler K. M. (2009). Laterality and location influence catamenial seizure expression in women with partial epilepsy. *Neurology* 73:223-227.
- Ramsden, M., Shin, T. M. y Pike, C. J. (2003). Androgens Modulate Neuronal Vulnerability to Kainate Lesion. *Neuroscience*, 122:573-578.
- Reddy, D. S. (2004). Testosterone Modulation of Seizure Susceptibility is Mediated by Neurosteroids 3 α -Androstanediol and 17 β -Estradiol. *Neuroscience*, 129:195-207.
- Reddy D. S. (2009) The role of neurosteroids in the pathophysiology and treatment of catamenial epilepsy. *Epilepsy Res.* 85(1):1-30.
- Reddy D. S. Rogawski M. A. (2009) Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. *Neurother.* 6(2):392-401.
- Rey, M., Kruse, M.S., Alvarez, L.D., Ghini, A.A, Veleiro, A.S., Burton, G. y Coirini, H. (2013). Neuroprotective action of synthetic steroids with oxygen bridge. Activity on GABA_A receptor. *Experimental Neurology*. 249:49-58.

- Rodgers, R.J. y Dalvi, A. (1997). Anxiety, Defense and the Elevated Plus-Maze. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 21(6):801-10.
- Rupprecht, R. y Holsboer, F. (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives, *Trends Neurosci.* 22: 410-416.
- Sabaliauskas, N., Shen, H., Homanics, G.E., Smith, S. S. y Aoki, C. (2012) Knockout of the γ -aminobutyric acid receptor subunit $\alpha 4$ reduces functional δ -containing extrasynaptic receptors in hippocampal pyramidal cells at the onset of puberty. *Brain Res.* 11-23.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. y Tapia, R. (1994). Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusión of gamma-amino butyric acid. *Neurochem Int.* 24: 363-368.
- Sana, E., Mostallino, Mc., Busonero, F., Talani, G., et al. (2003) Changes in GABA(A) receptor gene expresión asociated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal. *J Neurosci.* 23:11711-11724.
- Scharfman, H.E., y MacLusky, N.J. (2006). The influence of Gonadal Hormones on Neuronal Excitability, Seizures, and Epilepsy in the Female. *Epilepsia.* 47(9): 1423-1440.
- Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of GABA_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 47:181-234.
- Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J. y Naquet, R. (1992). Burst Generation in Neocortical Neurons after GABA Withdrawal in The Rat. *J Neurophysiol* 67: 715-727.
- Silva-Barrat C, Velluti J, Szente M, Batini C, Champagnat J. (2005). Exaggeration of Epileptic-Like Patterns by Nicotine Receptor

- Activation during the GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Res.* 1042(2): 133-143.
- Silva-Barrat, C. Szente, M., Menini, C., Velluti, J. C. y Champagnat, J. A. (2001). Muscarinic Depression of Synaptic Transmission in the Epileptogenic GABA Withdrawal Syndrome Focus. *J Neurophysiol.* 85: 2159-2165
- Silva-Barrat, C. y Champagnat, J. A. (1995). Potassium Current Controls Burst Termination in Rat Neocortical Neurons after GABA Withdrawal. *Neurosci. Lett.* 189(2): 105-108.
- Smith, S.S. y Gong, Q.H. (2005). Neurosteroid administration and withdrawal alter GABA_A receptor kinetics in CA1 hippocampus of female rats. *J Physiol*; 564:421-436.
- Smith, S.S. y Rudolph, U. (2012). Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. *Neuropharmacology.* 62: 54-62.
- Smith, S.S., Shen, H. y Gong, Q.H. (2005). Short-term steroid treatment increases δ GABAA receptor subunit expression in rat CA1 hippocampus: Pharmacological and behavioral effects. *Neuropharmacol.* 49(5):573-586.
- Smith, S.S., Shen, H., Gong, Q.H. y Zhou, X. (2007). Neurosteroids regulation of GABA-A receptors: Focus on the alpha 4 and delta subunits. *Pharmacol Ther.* 116:58-76.
- Smith, S. S. (2012) The influence of stress at puberty on mood and learning: role of the $\alpha_4\beta\gamma$ GABA_A receptor. *Neuroscience.* 1-21.

- Smith, K.S. y Rudolph, U. (2012). Anxiety and depression: Mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. *Neuropharmacology* 62: 54-62.
- Sur, C., Farrar, S.J., Kerby, J., Whiting, J.P., Atack, J.R y McKernan, R.M. (1999). Preferential coassembly of $\alpha 4$ and δ subunits of the GABA_A receptor in rat thalamus. *Mol Pharmacol.* 56:110-115.
- Tiihonen, J., Kuikka, J., Rasanen, P., Lepola, U., Koponen, H., Liuska, A., Lehmusvaara, A., et al. (1997). Cerebral benzodiazepine receptor binding and distribution in generalized anxiety disorders: a fractal analysis. *Mol Psychiatry.* 6:463-471.
- Toki S, Saito T, Hatta S, Takahata N. (1996). Dz and withdrawal in rats is associated with alteration in GABA_A receptor function. *Life sciences* 59(19): 1631-1641.
- Tsutsui, K., Ukena, K., Usui, M., Sakamoto, H. y Takase, M. (2000). Novel Brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res.* 36:261-273.
- Veleiro, A.S. y Burton, C. (2009). Structure-activity relationships of neuroactivo steroids acting on the GABA_A receptor- *Curr. Med. Chem.* 16:1-18.
- Ward B. O, Stephens D. N. (1998) Sensitisation of withdrawal signs following repeated withdrawal from benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure sensitivity. *Psychopharmacol.* 135:342-352.
- Wei, W., Zhang, N., Peng, Z., Houser, C.R. y Mody, I. (2003). Perisynaptic localization of δ subunit-containing GABA_A receptors and their

- activation by GABA spillover in the mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23, 10650-10661.
- Weiller, E., Bisserbe, J.C., Maier, W. y Lecrubier, Y. (1998). Prevalence and recognition of anxiety syndromes in five European primary care settings. A report from WHO study in Psychological Problems in General Health Care. *Br. J.Psychiatry Suppl.* 173:18-23.
- Whiting, P (2003). GABAA receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov. Today* 8:445-450.
- Will, B., Tonilo, G. y Brailowsky, S. (1988). Unilateral Infusion of GABA and Saline into the Nucleus Basalis of Rats: 1. Effects on Motor function and Brain Morphology. *Behavioural Brain Research.* 27: 123- 129.
- Zheng P. (2009). Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiol.* 89:134-152.