



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**RESPUESTA ANSIOLÍTICA AL DIAZEPAM EN
UNA CEPA HIPER-REACTIVA AL ESTRÉS
SOMETIDA A UN ESQUEMA DE ABSTINENCIA A
PROGESTERONA**

**T E S I S :
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
GABRIELA UGALDE FUENTES**

Directora: **Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena**
Investigador en Ciencias Médicas "D"
(INPRFM)

Asesor interno: **Dra. Leticia Morales Ledesma**



Ciudad de México., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por abrirme la puertas de esta gran institución.

A la **FES-Zaragoza** por brindarme la formación profesional

Al **Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”**, por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.

A la **Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena** por brindarme la oportunidad de ingresar a su laboratorio, por su apoyo, asesoría y en especial su confianza.

A la **Dra. Leticia Morales Ledesma** por su asesoría y tiempo brindado para el desarrollo de este proyecto.

Al **CINVESTAV sur**; a la **Dra. Carolina López Rubalcava** por la beca recibida (No. CB2010/155255).

Al **CINVESTAV sur**; a la **Dra. Carolina López Rubalcava, Isabel Beltrán**, por brindarme los animales de la cepa WKY utilizados para este proyecto.

A **los sinodales** por sus observaciones y aportaciones para este proyecto

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Juana Monroy Moreno

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

A la **Biol. Itzel O. Banda Martínez** por su asesoría en el análisis de los modelos conductuales

Al grupo de trabajo de Laboratorio por sus aportaciones y observaciones de este trabajo **Dra. Nelly, Dra. Alejandra, Danna**

DEDICATORIA

A mis padres **Froilán** y **Francisca** no encuentro las palabras para expresar mi afecto, agradecimiento y admiración. Gracias

A mis hermanos **Froylán, Tania** y **Miriam** por su apoyo, ánimos e inspiración para seguir siempre adelante.

A **Jorge A.** Gracias por tu apoyo y por esos momentos de alegría

A todos mis **familiares** y **amigos** de quienes siempre he recibido su apoyo en algún momento de mi vida.

La mayoría de la gente dice que el intelecto es lo que hace un gran científico. Están equivocados: es el carácter. Albert Einstein

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. ANTECEDENTES	11
3.1 <i>Sistema nervioso central</i>	11
3.2 <i>Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal</i>	11
3.3 <i>Ciclo menstrual</i>	12
3.3.1 <i>Fase folicular temprana (días 1 a 4)</i>	12
3.3.2 <i>Fase folicular mediana (días de 5 a 7)</i>	12
3.3.3 <i>Fase folicular tardía (días 8 a 12)</i>	13
3.3.4 <i>Fase preovulatoria (días 12 a 14)</i>	13
3.3.5 <i>Fase luteínica inicial (días 15 a 21)</i>	13
3.3.6 <i>Fase luteínica media (días 22 a 24)</i>	14
3.3.7 <i>Fase luteínica tardía o luteolítica (días 25 a 28)</i>	14
3.4 <i>Ciclo estral de la rata</i>	15
3.5 <i>Síndrome premenstrual y trastorno disfórico premenstrual</i>	18
3.6 <i>Ansiedad</i>	20
3.7 <i>Benzodiazepinas</i>	21
3.8 <i>Tratamiento de la ansiedad durante el síndrome premenstrual</i>	22
3.9 <i>Modelo animal de síndrome premenstrual de abstinencia a progesterona</i>	23
3.10 <i>Modelos animales para el estudio de la ansiedad</i>	25
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. HIPÓTESIS	28

6. OBJETIVOS	28
6.1 Objetivo general.....	28
6.2 Objetivos particulares:	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS	29
7.1 <i>Animales</i>	29
7.2 <i>Frotis vaginal</i>	29
7.3 <i>Administración de progesterona</i>	30
7.4 <i>Administración del fármaco diazepam</i>	30
7.5 <i>Modelo de laberinto elevado en cruz</i>	31
7.6 <i>Modelo de enterramiento defensivo</i>	32
7.7 <i>Diseño experimental</i>	33
7.8 <i>Diagrama general de trabajo</i>	34
7.9 <i>Análisis estadístico</i>	35
8. RESULTADOS	36
8.1 <i>Modelo laberinto elevado en cruz</i>	36
8.2 <i>Modelo de enterramiento defensivo</i>	40
8.3 <i>Campo abierto</i>	48
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES	52
11. PERSPECTIVA	52
12. BIBLIOGRAFÍA	53

13. ANEXO.....	60
i. Listado de abreviaturas	60
ii. Listado de cuadros.....	60
iii. Listado de figuras.....	61
iv. Diagrama	61

1. RESUMEN

Actualmente la frecuencia de trastornos de tipo ansioso ha aumentado, posiblemente debido a factores ambientales estresantes. Existe una prevalencia de 2 a 1 entre mujeres y hombres, en el caso de las mujeres se ha ligado la aparición de cuadros ansiosos a factores hormonales.

La etiología de los trastornos ansiosos es multifuncional, hay varias líneas que proponen que la caída brusca de progesterona (P_4), podría desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de cuadros de ansiedad, por ejemplo la abstinencia a progesterona o la retirada de la misma se han utilizado como modelo animal para simular el síndrome premenstrual (SPM) y el trastorno disfórico premenstrual (TDPM). Otro factor que podría contribuir al desarrollo del SPM es la alteración funcional del eje Hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), sin embargo se desconoce si la alteración funcional del eje HHA contribuye a la respuesta al tratamiento ansiolítico.

Por lo anterior, en el presente estudio se analizó el efecto ansiolítico del diazepam (DZ) en condiciones de abstinencia a progesterona en una cepa de ratas hiperreactiva al estrés, Wistar-Kyoto (WKY, con rasgo de ansiedad). Los animales formaron dos grupos para cada cepa fueron administrados con aceite de maíz (0.2 mL/día, sc.) y progesterona (0.5 mg/Kg en 2 mL/día, sc.) durante cinco días consecutivos, en el día seis se les administró una dosis de DZ (0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/Kg, ip.) 30 minutos antes de la aplicación de las pruebas conductuales. Los modelos de ansiedad utilizados fueron: laberinto elevado en cruz (LEC) y enterramiento defensivo (ED).

Los resultados mostraron que en las ratas W, el DZ reduce la ansiedad en los animales tratados con vehículo más no en aquellas sometidas al esquema de abstinencia a progesterona. En la cepa WKY el DZ no produjo efecto de tipo ansioso ni en los animales tratados con vehículo ni las sometidas al esquema de abstinencia a progesterona. El LEC mostro ser más sensible para detectar el efecto ansiolítico del DZ que el modelo de ED en la cepa W

Nuestros resultados muestran que la sensibilidad al diazepam depende de la cepa estudiada, en este caso la cepa WKY no es sensible al tratamiento. Así mismo la cepa WKY es más sensible al esquema de abstinencia a progesterona. Este modelo animal puede ser un modelo útil para evaluar los periodos de la caída endógena de progesterona en el síndrome premenstrual (SPM) y el trastorno disfórico premenstrual (TDPM).

2. INTRODUCCIÓN

En México la Secretaría de Salud destina a la salud mental 2% del presupuesto total asignado, de este el 80% se utiliza para los gastos en hospitales psiquiátricos. De acuerdo con el Informe de la Evaluación del Sistema de Salud Mental utilizando el Instrumento de Evaluación para el Sistema de Salud Mental de la Organización Mundial de la Salud, los trastornos psiquiátricos de mayor prevalencia son: trastornos afectivos, de ansiedad y psicóticos por lo tanto, son los que generan más gastos de salud mental (IESM-OMS, 2011).

La ansiedad ocupa uno de los primeros lugares de padecimientos psiquiátricos y su frecuencia aumenta debido a factores ambientales estresantes (Rodríguez-Landa y Contreras, 1998). Existen estudios que muestran una mayor evidencia entre los 15 y 45 años de edad, con una proporción de 2 a 1 entre mujeres y hombres (Virgen *et al.*, 2005; Bandelow *et al.*, 2014). En términos generales, la ansiedad puede ser una emoción normal o un trastorno psiquiátrico, dependiendo de la intensidad y de su repercusión en la vida de la persona que la presenta y se caracteriza por una sintomatología variada que combina síntomas físicos (asfixia, sofocos, dolor de cabeza, etc.) y psicósomáticos (sudoración, palpitaciones, fatiga, insomnio, etc.) (Hurlé, 2012).

La etiología de los trastornos ansiosos es multifactorial pero se considera que algunos de los factores fisiológicos que generan o exacerban un cuadro ansioso son los cambios hormonales que ocurren a lo largo del ciclo menstrual particularmente en la fase lútea tardía del ciclo, conocida como fase premenstrual (Nillni *et al.*, 2011). De hecho, varios grupos han estudiado el papel de las hormonas gonadales como factores que pueden desencadenar enfermedades mentales como depresión y ansiedad a lo largo de la vida reproductiva de la mujer, particularmente en el síndrome premenstrual (SPM) y el trastorno disfórico premenstrual (TDPM) (Estrada-Camarena *et al.*, 2011).

Por lo anterior, en los últimos años, se han desarrollado modelos animales que permiten simular condiciones endocrinas con el fin de identificar sustratos neurobiológicos de los trastornos ansiosos en la mujer y a su vez, la generación de tratamientos alternativos. Por ello, el uso de cepas de animales específicas que exhiban respuestas únicas a los estímulos ansiogénicos puede ayudar en el establecimiento de nuevos parámetros de comportamiento que den lugar a un cuadro tipo ansiedad y a su tratamiento (De la Garza *et al.*, 2004). Tal es el caso de la cepa Wistar-Kyoto (WKY) que se propone como un modelo animal en el que coexisten signos de ansiedad y depresión de manera basal y que es hiper-reactiva a los estímulos estresantes. En este trabajo se utilizó como modelo experimental dicha cepa y en ella se evaluó si el efecto ansiolítico del diazepam cambia en condición de abstinencia a progesterona.

3. ANTECEDENTES

3.1 *Sistema nervioso central*

La función del sistema nervioso central (SNC) consiste en regular las diversas actividades del organismo (Guyton y Hall, 2011).

El SNC contiene más de 100.000 millones de neuronas (Guyton y Hall, 2011), comprende al encéfalo (hemisferios cerebrales, diencefalo, cerebelo y tronco del encéfalo) y la médula espinal (Purves, 2004).

La mayor parte de las actividades del sistema nervioso se ponen en marcha cuando las experiencias sensitivas estimulan los receptores sensitivos, ya sean de carácter visual, auditivo, táctil en la superficie del organismo o de otro tipo. Estas experiencias sensitivas desencadenan reacciones inmediatas del encéfalo, o almacenarse como recuerdo durante minutos, semanas o años y determinar reacciones corporales en algún momento futuro (Guyton y Hall, 2011).

3.2 *Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal*

La regulación de los ciclos ováricos es controlada por el SNC (Kilen y Schwartz, 1998). El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal ejerce el control cíclico de la producción hormonal ovárica mediante la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés, *gonadotropin-releasing hormone*). Esta a su vez, en la adenohipófisis estimula la secreción de otras dos denominadas gonadotropinas la luteinizante (LH), y la estimulante del folículo (FSH) (Guyton y Hall, 2011). Ambas actúan en los ovarios, estimulando la secreción de estradiol e incluyen la formación de cuerpo lúteo y la secreción de progesterona, mismas que a su vez regulan los procesos de retro alimentación negativa en el hipotálamo y la hipófisis (Kilen y Schwartz, 1998).

3.3 Ciclo menstrual

Desde el comienzo de la pubertad y hasta la menopausia, el ovario produce una serie de secreciones hormonales cíclicas, que a través de su acción, darán lugar al ciclo menstrual (Tresguerres, 2011).

3.3.1 Fase folicular temprana (días 1 a 4)

Esta fase comienza con el inicio del sangrado menstrual, que corresponde en realidad a la terminación del ciclo precedente. Durante estos días del ciclo menstrual, contando a partir del inicio de la menstruación, comienza el desarrollo progresivo de una serie de folículos primarios gracias a las concentraciones elevadas de FSH fundamentalmente. Los niveles altos de FSH ayudan en el desarrollo, de los folículos y elevan además el número de receptores para LH en las células de la granulosa y de la teca (Tresguerres, 2011).

3.3.2 Fase folicular mediana (días de 5 a 7)

Según progresa el desarrollo folicular, los elementos celulares de esta estructura adquieren mayor capacidad esteroideogénica; esto lleva a un lento y progresivo aumento de estrógeno así como de la hormona inhibina, los cuales a su vez determinan la disminución de la concentración de FSH y permiten que la relación de FSH: LH llegue a ser inferior a 1. Esta caída de las concentraciones de FSH causa que los folículos menos dotados de receptores a FSH experimentan gradualmente un proceso de atresia (degeneración folicular y la reabsorción de un folículo ovárico antes de que alcance la madurez). Por el contrario, el folículo mejor preparado continúa su desarrollo hasta convertirse en el dominante (Tresguerres, 2011).

3.3.3 Fase folicular tardía (días 8 a 12)

Este periodo se caracteriza por el incremento de estrógenos procedentes del folículo dominante hasta alcanzar valores máximos entre 40 y 50 horas antes de la aparición del pico ovulatorio de la LH (Tresguerres, 2011).

Al final de esta fase las concentraciones de LH y FSH comienzan a elevarse para dar lugar al pico ovulatorio, en el que la LH se incrementa más que la FSH (Tresguerres, 2011).

3.3.4 Fase preovulatoria (días 12 a 14)

En este periodo se alcanza el pico máximo de secreción de estradiol, con las concentraciones entre 200 y 400 pg/ml. Entre 24 y 48 horas después de este pico aparece el de LH y FSH, que a su vez alcanzan valores máximos entre 16 y 24 horas antes de la ovulación. Una vez ocurrida la ovulación disminuyen las concentraciones de estrógenos. La progesterona que durante la fase folicular se ha mantenido en niveles bajos, aumenta lentamente (Tresguerres, 2011).

3.3.5 Fase luteínica inicial (días 15 a 21)

Después de la ovulación hay un periodo de cerca de tres días en el cual, a partir de los restos foliculares y por la acción fundamental de la LH, se forma el cuerpo lúteo, que será el elemento funcional protagonista de la segunda mitad del ciclo menstrual (Tresguerres, 2011).

Esta fase se caracteriza por un incremento rápido de las concentraciones plasmáticas de progesterona, que se relacionan con la maduración inicial del cuerpo lúteo. Los estrógenos, tras una fase de disminución post-ovulatoria, vuelven a incrementarse. La LH y FSH disminuyen de manera progresiva hasta alcanzar, al final de esta fase, valores análogos a los encontrados en el periodo folicular.

El endometrio se transforma en secretor, esto es idóneo para permitir el anidamiento del embrión en el útero, en caso de que haya fecundación (Tresguerres, 2011).

3.3.6 Fase luteínica media (días 22 a 24)

La progesterona alcanza su máxima concentración plasmática (10 y 20 ng/mL), y los estrógenos alcanzan un segundo pico, inferior al de la fase periovulatoria (150 y 250 pg/mL).

Las concentraciones de gonadotropinas son las más bajas de todo el ciclo menstrual, de acuerdo con la acción de retroalimentación negativa ejercida en conjunto por estrógenos y progesterona (Tresguerres, 2011).

3.3.7 Fase luteínica tardía o luteolítica (días 25 a 28)

Se caracteriza porque empieza a declinar la secreción de progesterona y estradiol, acompañada del inicio de incremento de las gonadotropinas, sobre todo de la FSH. El cuerpo lúteo involuciona por el proceso de luteólisis, hasta que las concentraciones hormonales esteroideas disminuyen. Al disminuir las concentraciones plasmáticas, deja de actuar la retroalimentación negativa sobre las gonadotropinas y se incrementan las concentraciones de FSH. Las concentraciones bajas de esteroides ováricos determinan la separación de la mucosa endometrial y el inicio del flujo menstrual (Tresguerres, 2011).

3. 4 Ciclo estral de la rata

El término estral se deriva de la palabra en latín “*oistros*” que significa “frenesí”, corresponde con la etapa en la que la hembra es receptiva al macho (Kilen y Schwartz, 1998). La rata, presenta ciclos estrales de cuatro a cinco días de duración (Freeman, 1994) dependiendo de la cepa y el periodo de luz/oscuridad en que se mantengan los animales (Schwartz, 2000). En la rata, el ciclo estral se divide en cuatro fases: **estro**, **metaestro** o **diestro-1**, **diestro** o **diestro-2** y **proestro** (Kilen y Schwartz, 1998).

La duración promedio de cada una de estas etapas depende de las condiciones en las que se mantiene al animal, según Freeman, 1994, los días de diestro-1 y diestro -2 duran 61 a 65 h, de proestro 12 a 14 h y estro 25 a 27 h.

El día del **estro**, se describe como el tiempo en el que la hembra es receptiva al macho. El frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo (Bautista, 2006). En la madrugada de este día ocurre la ovulación. Las concentraciones de estradiol, progesterona y LH son las más bajas del ciclo estral (basales), la FSH aumenta en la mañana de este día, la función es reclutar los folículos que empezarán a crecer y ovularán en ciclos posteriores (Kilen y Schwartz, 1998).

Etapa de **diestro-1** es un periodo de recuperación, la citología vaginal presenta una gran cantidad de leucocitos. El cuerpo lúteo secreta progesterona por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona alcance un segundo “pico” hacia el mediodía. Las concentraciones de estradiol, LH y FSH son basales durante este día (Kilen y Schwartz, 1998).

En el **diestro-2**, en el frotis vaginal se observa una menor cantidad de leucocitos. La concentración de estradiol empieza a aumentar paulatinamente (Kilen y Schwartz, 1998)

Durante estro, metaestro, diestro y en la mañana del proestro se mantienen los niveles basales de LH y FSH, debido a los efectos de retroalimentación negativa por el estradiol y la progesterona.

En el **proestro**, el frotis se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. En la mañana de ese día, la concentración de estradiol alcanza el valor máximo del ciclo; 1400-1600 h más tarde, la disminución de estradiol induce el aumento de LH y FSH. Los niveles séricos de ambas gonadotropinas aumentan rápidamente, generando el pico preovulatorio, que a su vez, induce la ruptura folicular y la ovulación en el ovario 10-14 h más tarde. Los niveles séricos de LH y FSH comienzan a declinar 1800 a 1900 h posteriores al pico preovulatorio. Por la mañana del estro, los niveles de LH han vuelto a su nivel basal; FSH muestra un aumento secundario antes de descender a su nivel basal en la noche del estro (Kilen y Schwartz, 1998).

El aumento pulsátil de LH coincide con el aumento pulsátil de GnRH, como establecimiento de la señal primaria para el pico preovulatorio (**Figura 1**).

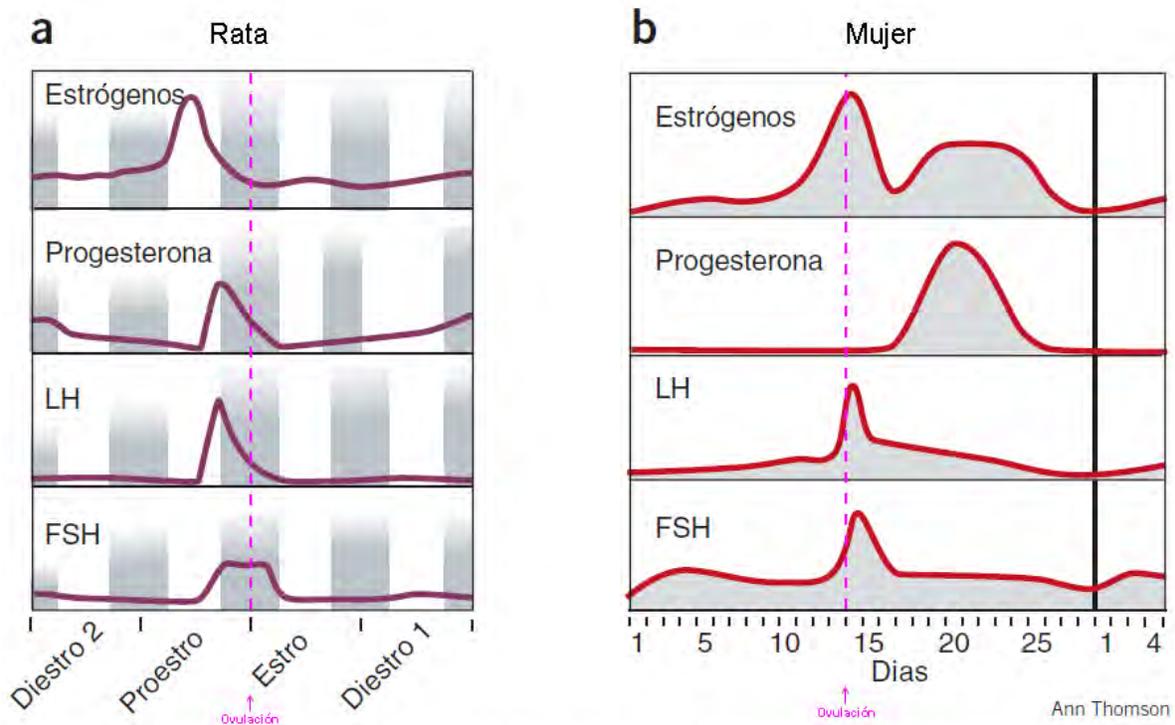


Figura 1. Comparación del ciclo estral de la rata y el ciclo menstrual del humano. **a)** El ciclo estral de 4 días de la rata (barras grises indican la noche, 6 pm-6 am), que muestra las fluctuaciones de los estrógenos, progesterona, hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH). **b)** El ciclo menstrual femenino de 28 días. Se cree que el momento de la caída de progesterona es al final del ciclo, aproximadamente en el inicio de la menstruación (Modificado de Staley y Scharfman, 2005)

3. 5 Síndrome premenstrual y trastorno disfórico premenstrual

El SPM se define como un patrón cíclico de síntomas que causan algún grado de deterioro mental y físico (Löfgren *et al.*, 2009). Los síntomas físicos característicos son: fatiga, dolor del cuerpo, hipersensibilidad en los senos, etc.; entre los comportamientos psicológicos destaca irritabilidad, ansiedad, dificultad de concentración, etc. (Dickerson *et al.*, 2003; Biggs y Demuth, 2011) ver (**cuadro 1**). Estos aparecen en la fase lútea tardía y el declive de estos se presenta después del comienzo de la menstruación (Su *et al.*, 1997; Freeman, 2003).

La forma severa del SPM, se le denomina TDPM, que difiere del SPM en la intensidad de los síntomas físicos y el predominio de los síntomas psiquiátricos se destacan cuatro síntomas principales: estado de ánimo depresivo o disforia, ansiedad o tensión, labilidad afectiva e irritabilidad, entre otros síntomas secundarios ver **cuadro 1 y 2** (Firoozi *et al.*, 2012).

Los síntomas del TDPM deben de estar presentes durante más de una semana antes de la menstruación, disminuyen unos días después de la aparición de la menstruación, y están completamente ausentes en la semana siguiente a la menstruación; 1) ≥ 5 síntomas deben de ocurrir en la mayoría de los ciclos menstruales durante los últimos 12 meses; 2) los síntomas interfieren significativamente con las relaciones escuela/trabajo, o las actividades habituales (Biggs y Demuth, 2011).

De los síntomas psiquiátricos principales del SPM y el TDPM se destaca la ansiedad y el estado de ánimo deprimido que en muchos casos llega a interferir con las relaciones personales y laborales de quienes las presentan.

Cuadro I. Síntomas asociados con el síndrome premenstrual (SPM) y trastorno disfórico premenstrual (TDPM)	
Físicos	Comportamiento Psicológico
<ul style="list-style-type: none"> • Hinchazón abdominal • Dolor de cuerpo • Hipersensibilidad en los senos • Calambres, dolor abdominal • Fatiga • Dolores de cabeza • Náuseas • Hinchazón de extremidades • Aumento de peso 	<ul style="list-style-type: none"> • Ira, irritabilidad • Ansiedad • Cambios en el apetito (comer en exceso o antojos de alimentos) • Cambios en el libido • Dificultad de concentración • Estado de ánimo deprimido • Sensación de fuera de control • Cambios de humor • Sueño • Tensión
Tomado de Biggs y Demuth, 2011	

Cuadro II. Criterios clínicos para el trastorno disfórico premenstrual (TDPM)
<p>Los síntomas del TDPM deben de estar presentes en la mayoría de los ciclos menstruales durante el último año, cinco (o más) de los siguientes síntomas deben haber estado presentes durante la mayor parte de la última semana de la fase lútea, comenzó a remitir a los pocos días después del inicio de la menstruación, permaneciendo ausentes después de la menstruación. Al menos uno de los síntomas debe de ser 1, 2, 3, 4:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Estado de ánimo depresivo o disforia 2. Ansiedad o tensión 3. Labilidad afectiva 4. Irritabilidad 5. Disminución del interés por las actividades habituales 6. Dificultad de concentración 7. Marcada falta de energía 8. Marcado cambio en el apetito, comer en exceso, o los antojos de alimentos específicos 9. La hipersomnia o insomnio 10. Sentirse abrumado 11. Otros síntomas físicos, como sensibilidad en los senos, dolores de cabeza, dolor muscular, sensación de distensión, aumento de peso. <p>– Los síntomas interfieren notablemente con el trabajo, la escuela, las actividades sociales habituales</p> <p>– Los síntomas no son solo una exacerbación de otro trastorno</p> <p>– Los tres primeros criterios deben de ser confirmadas por calificaciones diarias durante al menos dos ciclos menstruales consecutivos.</p>
Tomado de Cunningham et al., 2009; Biggs y Demuth, 2011.

3.6 Ansiedad

La ansiedad es una de las enfermedades psiquiátricas más comunes (Scaini *et al.*, 2014) y se considera incapacitante ya que representa graves consecuencias para los individuos que la sufren (Reus *et al.*, 2014).

La ansiedad es un fenómeno natural que asegura la supervivencia del individuo, se produce en respuesta al peligro y prepara un organismo para hacer frente al entorno jugando un papel fundamental en su supervivencia (Gutiérrez-García y Contreras, 2013). En condiciones normales constituye uno de los impulsos vitales que motivan al individuo a realizar sus funciones y a enfrentarse a situaciones nuevas, se convierte en patológica cuando en lugar de favorecer el comportamiento, interfiere en él (Hürle, 2012). Se caracteriza por “un miedo marcado y persistente por una o más situaciones sociales a las que la persona está expuesta o al posible escrutinio de otros” (*American Psychiatric Association*, 2013), los síntomas físicos habitualmente son: asfixia, sofocos o escalofríos, palpitaciones, desmayos, agitación y dolor de cabeza (Beidel *et al.*, 1999).

La ansiedad es un estado patológico incapacitante que implica alteraciones cognitivas, emocionales y fisiológicas (Gutiérrez-García y Contreras, 2013). Interfiere de manera negativa con las actividades cotidianas de quienes las padecen (Bouton *et al.*, 2001).

3.7 Benzodiazepinas

Las benzodiazepinas (benzo 1, 4 diazepinas; BDZ) (**Figura 2**) son los principales agentes utilizados en el tratamiento de la ansiedad (Rodríguez-Landa y Contreras, 1998), son fármacos sintéticos cuyo uso clínico comenzó por la década de los 60's con el primer agente, clordizepóxido. Dentro de las benzodiazepinas prescritas con mayor frecuencia está el diazepam, el clordiazepóxido, el clonazepam, el lorazepam y el alprazolam (Rodríguez-Landa y Contraeras, 1998).

Poseen en común las siguientes propiedades farmacológicas: son ansiolíticos, sedantes- hipnóticos, miorreajantes, anticonvulsantes, son útiles en la medicación pre-anestésica y para el mantenimiento de la misma (Hurlé, 2012).

Químicamente están constituidas por un sistema anular heterocíclico formado por la unión de un anillo bencénico (A), un anillo diazepínico (B) que contiene dos átomos de nitrógeno, las benzodiazepinas contienen un sustituyente 5 arilo en el anillo C, (5-aril-1,4 benzodiazepinas) (Figura 2). Las diferentes sustituciones en los radicales originan las distintas benzodiazepinas (Hurlé, 2012).

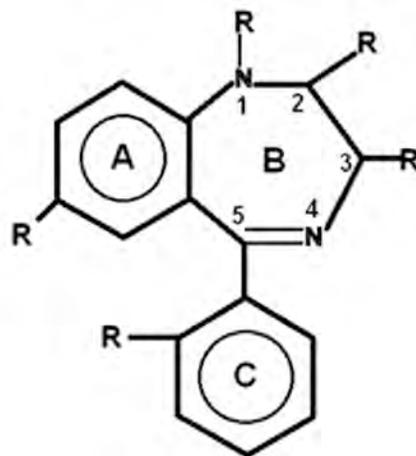


Figura 2. Estructura química de la benzodiazepina (Modificada de Hurlé, 2012).

3. 8 Tratamiento de la ansiedad durante el síndrome premenstrual

La regulación de la ansiedad está asociada a la función del receptor GABA de tipo A (GABA_A-R) (Gulinello *et al.*, 2003). El receptor GABA_A es un canal cloruro, rodeado por un conjunto pentamérico de subunidades: α 1-6, β 1-4, γ 1-4, ϵ , θ y δ las cuales forman diversas combinaciones y dan varias isoformas del GABA_A-R (Smith *et al.*, 2004). La isoforma GABA_A-R modula la ansiedad diferencialmente dependiendo de su ubicación en regiones específicas del cerebro (Smith *et al.*, 2004). Existen moduladores endógenos del GABA_A-R, tales como los metabolitos 5- α -reducidos de la progesterona, que regulan la expresión y la función del GABA_A-R (Smith *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2004). Como moduladores exógenos se pueden considerar a las BDZ y otros fármacos con propiedades ansiolíticas ya que ejercen sus acciones a través del sistema GABAérgico, vía el receptor GABA_A, mismo que contiene un sitio de afinidad para las BDZ y otro para esteroides (Olsen y Tobin, 1990; Rodríguez-Landa y Contreras, 1998).

En estudios preclínicos, la administración aguda de progesterona o de sus metabolitos 5- α -reducidos induce un efecto ansiolítico por la activación del GABA_A-R (Gullinello *et al.*, 2001; Rodríguez-Landa *et al.*, 2009). En contraste, cuando se administra de manera crónica y se suspende de manera brusca (abstinencia) aumenta la ansiedad y la expresión de una subunidad del GABA_A-R, la subunidad α 4, lo que genera alteraciones en la respuesta a varias clases de moduladores GABA_A y una insensibilidad a las BDZ (Smith *et al.*, 2004).

Durante el periodo premenstrual se observa una reducción de los efectos ansiolíticos y sedantes de las BDZ y los esteroides neuroactivos en mujeres con SPM (Estrada-Camarena *et al.*, 2011). De manera similar a lo que ocurre en los modelos animales, se ha propuesto que la insensibilidad al tratamiento con α -benzodiazepinas podría estar asociada a los cambios en la funcionalidad del GABA_A-R (Smith *et al.*, 2004).

3.9 Modelo animal de síndrome premenstrual de abstinencia a progesterona

La progesterona (P_4) deriva del latín: *pro*= a favor y *gestare*= llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción. P_4 (4-pregnen-3, 20-diona) es una molécula lipídica, formada por el núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, constituido por 21 átomos de carbono y grupos metilo en el átomo de carbono en posición 10 y 13 (Cantarow y Schepartz, 1988).

Los cambios bruscos en la concentración de P_4 , se ha vinculado al aumento de la vulnerabilidad para desarrollar trastornos de ansiedad en algunas mujeres. Se han mostrado evidencias que los cambios en las fluctuaciones endógenos de los neuroesteroides como la alopregnanolona y esteroides neuroactivos como la P_4 y sus metabolitos α -reducidos, puede desempeñar un papel en los trastornos del estado de ánimo y de la ansiedad (Gulinello y Smith, 2003).

En mujeres la concentración elevada de alopregnanolona (3 α hidroxilo-5 α -pregna-20-ona o 3 α , 5 α THP) están presentes durante la fase lútea del ciclo menstrual, el embarazo y durante la respuesta a estímulos estresantes (Löfgren *et al.*, 2006). La abstinencia de alopregnanolona resulta en el aumento de la ansiedad y el incremento en la expresión de la sub unidad $\alpha 4$ en los receptores a GABA en el hipocampo y la pérdida de la sensibilidad de la modulación del receptor GABA_A por las BDZ (Gulinello *et al.*, 2001).

En modelos animales se ha observado que la supresión de progesterona (SP_4) después de la exposición continua, desencadena conductas tipo ansiedad, razón por la cual se considera puede representar algunos signos del SPM (Gallo y Smith, 1993; Löfgren *et al.*, 2006). En ratas Long-Evans macho y hembra adultos de dos meses de edad y jóvenes de 23-25 días, la exposición a corto plazo con 0.5 mg/Kg de P_4 durante 48 h aumenta la ansiedad en el paradigma de laberinto elevado en cruz (*plus-maze*; EPM, por su siglas en inglés) alterando el potencial ansiolítico de la benzodiazepina lorazepam (Gulinello y Smith, 2003). Gulinello *et al.*, (2001) muestran que en ratas hembras Long-Evans de 110-120 g con

tratamiento a corto plazo por 3 ó 6 días inyectadas una vez por la mañana con P₄ (5 mg/0.2 mL), a 72 h después de la supresión del tratamiento, exhiben insensibilidad al efecto ansiolítico del lorazepam.

Estudios clínicos han mostrado que mujeres diagnosticadas con SPM y TDPM presentan concentraciones basales de cortisol bajas en comparación a mujeres sanas. El incremento de cortisol que se observa en respuesta al estrés, no se presenta en estas mujeres con SPM y TDPM (Girdler *et al.*, 2001). Esto sugiere que existe alguna alteración en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) que contribuye a la regulación de los síntomas clínicos de estas mujeres. Por lo anterior, es posible que estas alteraciones también contribuyan al tratamiento de síntomas psiquiátricos como la ansiedad y depresión que prevalecen en el TDPM.

Por otro lado, con el objetivo de estudiar y comprender las bases biológicas de la ansiedad, se han desarrollado estudios en animales (Cassano y Argibay 2009), lo que permite hacer manipulaciones y procedimientos que tienen limitaciones importantes cuando se trabaja con seres humanos (Marván, 1993). Una de las cepas de rata más utilizada es la Wistar-kyoto (WKY), la cual se considera un modelo animal genético de depresión y ansiedad (Páre y Redei, 1993). La cepa exhibe comportamiento de tipo depresivo y ansioso en numerosos modelos conductuales además de anomalías a nivel hormonal similares a los encontrados en seres humanos asociados con depresión particularmente en el funcionamiento del eje HHA (Estrada-Camarena *et al.*, 2011). Por lo anterior es considerada una cepa hiper-reactiva al estrés (Estrada-Camarena *et al.*, 2011). Por otro lado, evidencias recientes indican que los niveles elevados de glucocorticoides podrían disminuir la sensibilidad del receptor GABA_A/BDZ (López-Rubalcava *et al.*, 2013) y la dado que la cepa WKY presenta niveles elevados de los mismos es factible considerar que ésta cepa podría mostrar una respuesta disminuida o alterada a agentes GABAérgicos. Por lo que en este estudio se analizó en ratas WKY la sensibilidad a las BDZ, lo que nos permitirá sugerir alteraciones en el funcionamiento del GABA_A-R y por tanto proporcionar bases para la búsqueda de otros tratamientos.

3.10 Modelos animales para el estudio de la ansiedad

Los modelos animales de ansiedad miden la respuesta conductual, ante estímulos estresantes o novedosos, análogos a la expresión humana de esta patología (Sollozo-Dupont *et al.*, 2011). Un buen modelo animal para el estudio de trastornos psiquiátricos deben de cumplir al menos uno de los siguientes criterios a) *validez aparente*: debe ser análogo al desorden humano en su sintomatología b) *fiabilidad*: debe de ser altamente reproducible c) *validez predictiva*: la condición debe ser mejorada o atenuada por tratamientos efectivos en el tratamiento de trastornos humanos e) *validez constructo*: cambios en el modelo deben tener estrecha correspondencia en parámetros neuroquímicos o endocrinos descritos en pacientes (Estrada-Camarena *et al.*, 2011). Los modelos condicionados implican procedimientos de una respuesta incondicionada con un estímulo usualmente de castigo o conflicto mediante los cuales se entrena al animal para emitir o suprimir una respuesta (Cárdenas y Navarro, 2002). En contraste, las pruebas no condicionadas estudian el repertorio conductual natural del animal mediante estímulos estresantes o nuevos; un ejemplo es LEC y ED (Sollozo-Dupont *et al.*, 2011)

En el laberinto elevado en cruz (LEC), se puede cuantificar la exploración natural del animal en un ambiente novedoso y aversivo (Sollozo-Dupont *et al.*, 2011). Se basa en la aversión natural de las ratas en áreas abiertas y elevadas, así como su comportamiento exploratorio natural en ambientes nuevos (Lister, 1987); presenta dos zonas diferentes: una potencialmente aversiva (brazos abiertos) y otra segura (brazos cerrados). En estado natural la rata elige estar cerca de superficies verticales, preferiblemente rincones y lugares con poca iluminación, los campos abiertos les causan aversión, lo que explica su preferencia por los brazos cerrados (Miranda *et al.*, 2009).

El enterramiento defensivo (ED), proporciona una respuesta innata que tienen los roedores la cual consiste en enterrar el objeto amenazador o nocivo (Suckow *et al.*, 2006). Esta conducta se induce mediante un aparato que consta de una caja de acrílico con la base cubierta de aserrín y un electrodo adaptado a una de las paredes de la caja; cuando el animal entra en contacto con el electrodo, recibe un choque eléctrico de baja intensidad identifica a este como un estímulo aversivo; en respuesta, comenzara a enterrarlo (Fernández-Guasti, 2003). El tiempo invertido en enterrar la fuente aversiva es el principal indicador de ansiedad (Pinel y Treit 1978; De Boer y Koolhaas, 2003)

4. JUSTIFICACIÓN

La ansiedad es una de las enfermedades mentales que afecta entre el 5 y 10% de la población en general (Rodríguez-Landa y Contreras, 1998), reportándose una mayor incidencia en mujeres en edad reproductiva (Virgen *et al.*, 2005), particularmente cuando se presenta asociada a las fluctuaciones hormonales durante el periodo menstrual. Se considera incapacitante para las mujeres que la padecen y constituye un problema de salud pública dado que los pacientes tienen un impacto a nivel social, económico y personal, disminuyendo la calidad de vida (Moreno-Peral *et al.*, 2014).

El tratamiento para la ansiedad por excelencia son las BDZ (Gries *et al.*, 2005), sin embargo existen informes de que cuando se presenta un cuadro ansioso asociado a las fluctuaciones de hormonas gonadales, la sensibilidad al tratamiento disminuye (Sundström *et al.*, 1997). Por esto es necesario explorar alternativas de tratamiento con fin de generar nuevas estrategias.

Una característica de las mujeres que sufren ansiedad durante el periodo premenstrual es que son generalmente vulnerables a eventos estresantes (Yonkers, 1997), por lo que se requiere evaluar tratamientos farmacológicos en un modelo animal que simule esta condición. Una propuesta para simular esta condición es el uso de ratas de la cepa WKY, ya que presentan características de hiper-reactividad al estrés, muestra conductas tipo ansiosa y depresiva además responde al modelo de abstinencia a progesterona.

La caracterización de la respuesta al tratamiento de la ansiedad con las BDZ en la cepa WKY aportará bases para la búsqueda de nuevas estrategias para el tratamiento de la ansiedad.

5. HIPÓTESIS

Si la cepa WKY es hiper-reactiva al estrés, entonces el efecto de la abstinencia a progesterona será mayor y el efecto ansiolítico del diazepam será menor que el observado en la cepa W.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- ❖ Analizar el efecto del diazepam sobre la ansiedad inducida por la abstinencia a progesterona en una cepa de ratas hembra hiper-reactivas al estrés (WKY) y compararlo con la cepa control.

6.2 Objetivos particulares:

Evaluar el efecto de la abstinencia a progesterona y el diazepam en ratas Wistar-Kyoto (WKY) en el modelo de enterramiento defensivo (ED) y laberinto elevado en cruz (LEC) y compararlo con la cepa control Wistar.

- ❖ Analizar el efecto de diferentes dosis de diazepam en ratas WKY en el modelo LEC y ED.
- ❖ Estudiar el efecto de la abstinencia a progesterona en ratas de la WKY en el modelo de LEC y ED.
- ❖ Evaluar la respuesta farmacológica al diazepam, en ratas de la WKY con abstinencia a progesterona en el LEC.
- ❖ Estudiar la respuesta farmacológica al diazepam, en ratas de la WKY con abstinencia a progesterona en el ED.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 *Animales*

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron ratas hembras 3 meses de la cepa Wistar o WKY (n=8 por grupo) de 200-250g. Los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” bajo un ciclo controlado de luz/oscuridad invertido (12/12 h; encendido a las 21:00 h) y temperatura (22-24 °C). La comida y agua se suministró a libre demanda a lo largo del experimento. El objetivo de alojar a los animales bajo un ciclo de luz invertido es que se registre la conducta durante la fase de actividad de los animales (Fernández-Guasti y Picazo, 1997).

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la norma oficial mexicana para el cuidado de los animales y la manipulación (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por nuestro Comité de Ética Institucional.

7.2 *Frotis vaginal*

Se utilizaron animales cíclicos con al menos, dos ciclos estrales consecutivos regulares de cuatro días.

Se tomó una muestra de las células de la vagina de la rata con ayuda de un gotero con solución salina al 9%. La preparación en fresco se observó al microscopio (10X).

7.3 Administración de progesterona

Se inyectaron a los animales por vía subcutánea (sc.) 0.5 mg/Kg de peso corporal con progesterona, (Sigma-Aldrich, USA) disuelta en aceite de maíz. Se administró una vez iniciada la fase de oscuridad (10:00 h), durante cinco días (Saavedra *et al.*, 2006).

Como grupo de comparación se utilizaron animales que se les administro en misma frecuencia y mismo volumen el vehículo (vh) aceite de maíz (Saavedra *et al.*, 2006).

7.4 Administración del fármaco diazepam

En el sexto día, los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal (ip.) 30 min antes de las pruebas de conductuales (Fernández-Guasti y Picazo, 1997; Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2003) con diazepam (valium solución, Roche, Brasil) (DZ; 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/Kg)

Los animales control se inyectaron de manera similar con Propilen glicol (Sigma-Aldrich, USA) como vehículo de diazepam.

La ansiedad experimental se determinó en dos modelos conductuales en el LEC y ED. Se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento durante la fase oscura, entre 10:00 y 14:00 h.

7.5 Modelo de laberinto elevado en cruz

Las ratas se pusieron en el laberinto elevado, en una habitación con luz roja y bajos niveles de ruido. El aparato es una cruz elevada con dos brazos abiertos 50 x 10 cm y dos brazos cerrados de 50 x 10 x 40 cm. Los brazos se extienden a partir de una plataforma central de 10 x 10, se encuentran elevados a 50 cm del suelo. Las ratas se colocaron en la parte central y se contó el número de entradas y el tiempo que los animales permanecieron en los brazos abiertos o cerrados durante 10 min. El aumento en el tiempo de exploración en los brazos abiertos es indicativo de una menor ansiedad (Lister, 1987).

7.6 Modelo de enterramiento defensivo

El modelo de ED consiste en una caja de acrílico (27 x 16 x 23 cm) la base se cubrió con aserrín fino 2 cm por encima del suelo, un electrodo sobresale de una pared. El electrodo está conectado a una fuente de poder de corriente constante que cuando el animal hace contacto con él emite una descarga de 0.3 mA. El registro tiene una duración de 10 min, (Fernández-Guasti, 2003) durante este periodo se cuantifica:

- a) **Latencia de enterramiento**, que es el tiempo transcurrido desde que el animal recibe el primer choque hasta que empieza a presentar la conducta de enterramiento; esta medida refleja la reactividad o tiempo de reacción de los animales y permite distinguir el efecto ansiolítico del sedante (De Boer y Koolhaas, 2003).
- b) **Tiempo acumulativo de enterramiento**, tiempo en el que el animal invierte en enterrar el electrodo. Esta conducta refleja la ansiedad del animal, a mayor tiempo de enterramiento, mayor ansiedad (Pinel y Treit 1978; De Boer y Koolhaas, 2003).
- c) **Número de choques eléctricos**, una medida que sirve para descartar los posibles efectos analgésicos de los compuestos evaluados (Fernández-Guasti, 2003)
- d) **Acicalamiento**, estado natural de conducta de acicalamiento, sigue un patrón céfalo-caudal, sin embargo cuando los roedores son sometidos a niveles altos de estrés, rompen con este patrón o se acicalan una sola parte del cuerpo. Se cuantifica el tiempo acumulativo del acicalamiento dirigido al hocico (Kalueff y Tuohimaa, 2005), se obtuvo el tiempo invertido en la manifestación de conductas tipo ansiedad pasivo (congelamiento) y activa (acicalamiento y enterramiento)
- e) **Congelamiento** (“freezing”): se denomina congelamiento a la postura de inmovilidad en cuatro patas con la mirada fija hacia el electrodo. Esta conducta se considera como una expresión pasiva de la ansiedad (Rogel-Salazar y Lopéz-Rubalcava, 2011).

Para descartar que los tratamientos aplicados afecten la motricidad de los animales, se registró la actividad ambulatoria de los mismos en una caja de acrílico (33 X 44 X 20 cm). Los movimientos de los animales fueron cuantificados con el número de veces que el sujeto cruzo con las cuatro patas de un cuadro a otro, por un tiempo de 5 min.

7.7 Diseño experimental

Se formaron dos grupos para cada cepa. El **grupo 1** recibió como tratamiento aceite de maíz durante 5 días y el día 6 una dosis de diazepam (0, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/kg, ip.); al **grupo 2** se la administró una dosis diaria constante de progesterona (0.5 mg/kg, sc.) durante 5 días y al día 6 se administró una dosis de diazepam (0, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mg/kg, ip.). Después de 30 minutos de la inyección de diazepam todos los animales fueron sometidos a la prueba LEC y ED (**Diagrama 1**).

7.8 Diagrama general de trabajo

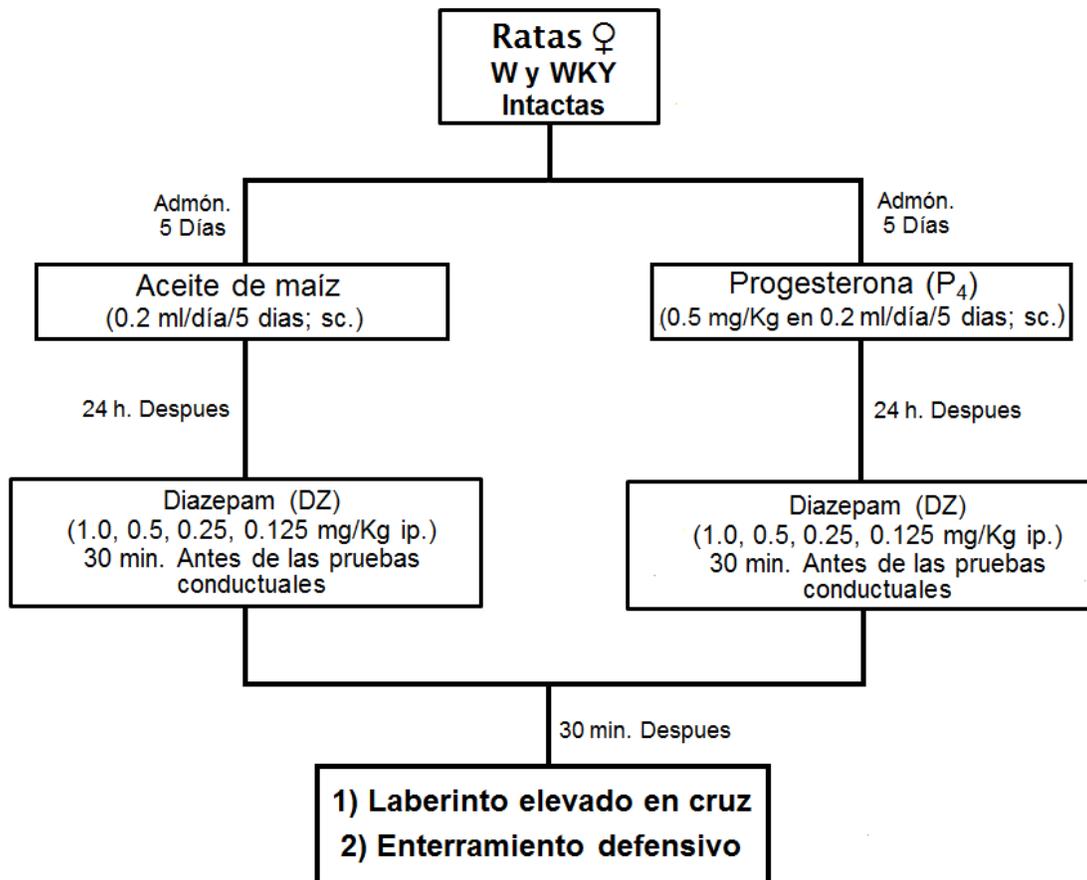


Diagrama 1. Diseño experimental

7.9 Análisis estadístico

Los parámetros analizados en LEC fueron el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados. En el ED se cuantificó la suma de las conductas activas (enterramiento-acicalamiento) y pasivas (freezing-Inmovilidad) en segundos; para los erguimientos, exploración al electrodo y número de choques los resultados se expresaron como el número de cuentas que pasaron en cada una de las variables analizadas.

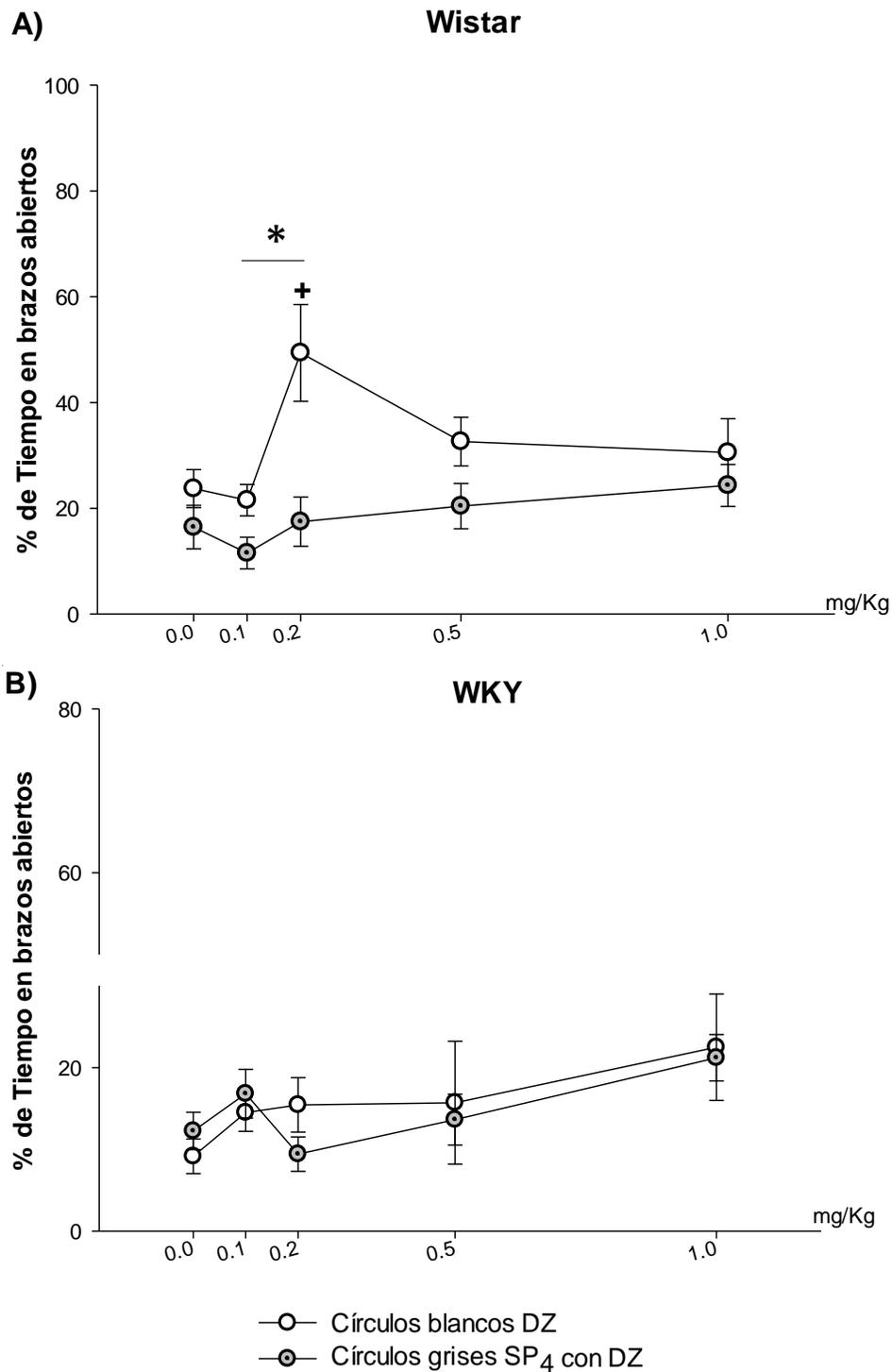
Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de análisis de varianza múltiple (ANOVA) de dos vías, seguido de la prueba post-hoc Holm-Sidak, considerando como factores: A) la cepa con dos niveles, W y WKY y; B) el tratamiento con 4 niveles, dosis de diazepam; las diferencias se consideraron como estadísticamente significativas a una $p < 0.05$. Se analizaron mediante el programa estadístico Sigma-plot 12.3

8. RESULTADOS

8.1 Modelo laberinto elevado en cruz

En las ratas W la administración de DZ incrementó el tiempo de permanencia en los brazos abiertos en la dosis 0.25 mg/Kg vs su vehículo ($p=0.005$) y 0.125 mg/Kg ($p=0.004$). Dosis mayores no modificaron de manera significativa el tiempo de permanencia en los brazos abiertos. El grupo a los que se les indujo abstinencia a progesterona y que recibieron diazepam (SP_4 con DZ) no mostraron cambios significativos en el tiempo en los brazos abiertos a ninguna de las dosis evaluadas. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: $1,67=19.41$, $p<0.001$; para el factor dosis F: $4,67=3.50$, $p=0.012$; para la interacción F: $4,67=2.11$, $p=0.08$. El análisis post-hoc mostró diferencias significativas al comparar el grupo de DZ vs SP_4 con DZ, en la dosis de 0.25 mg/Kg, ($p<0.001$) (**Figura 3 A**).

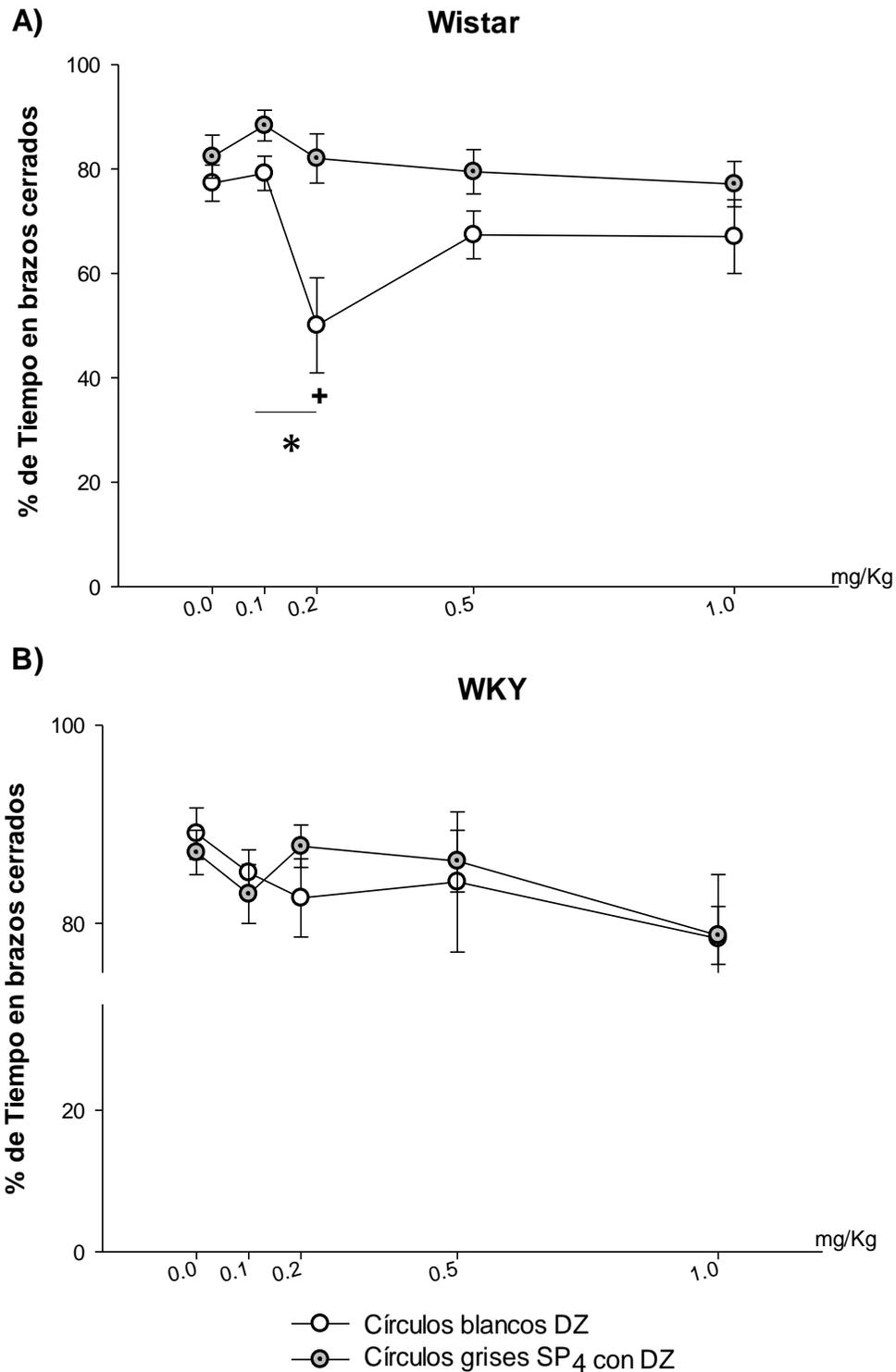
En las ratas WKY, se puede observar que la administración de DZ no modificó el tiempo en brazos abiertos a ninguna de las dosis evaluadas. Así mismo en los grupos a los que se les indujo SP_4 con DZ, ninguna de las dosis probadas modificó el tiempo de permanencia en brazos abiertos. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: $1,70= 0.09$, ns; para el factor dosis F: $4,70=2.23$, ns; para la interacción F: $4, 70=0.41$, ns.) (**Figura 3 B**)



La **Figura 3**. Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP₄ con DZ) sobre la permanencia en brazos abiertos en el modelo de laberinto elevado en cruz (LEC) en ratas Wistar A) *p<0.005= vs el grupo tratado con vehículo y 0.25 mg/kg vs 0.125 mg/kg; + p<0.005=DZ vs SP₄ con DZ y WKY B) *p<0.05. La prueba post-hoc Holm-Sidak.

En ratas W la administración 0.25 mg/Kg de DZ disminuyó el tiempo en brazos cerrados con respecto a vehículo ($p=0.003$), si se compara con dosis menores tal como 0.125 mg/Kg ($p=0.003$) se observa el mismo comportamiento. El grupo SP₄ con DZ, no modificó el tiempo en los brazos cerrados a ninguna de las dosis evaluadas. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: 1,67= 18.63, $p<0.001$; para el factor dosis F: 4,67=3.60, $p=0.01$; para la interacción F: 4, 67=1.99, ns. El análisis post-hoc mostró diferencias significativas al comparar el grupo tratado DZ vs SP₄ con DZ, en la dosis de 0.25 mg/Kg ($p<0.001$) (**Figura 4 A**).

En las ratas WKY la administración de DZ no modificó el tiempo de permanencia en brazos cerrados, en ninguna de las dosis evaluadas ni en el grupo control ni en el que se indujo la supresión brusca de progesterona. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: 1,70= 0.07, ns; para el factor dosis F: 4,70=1.46, ns; para la interacción F: 4, 70=0.29, ns.) (**Figura 4 B**).

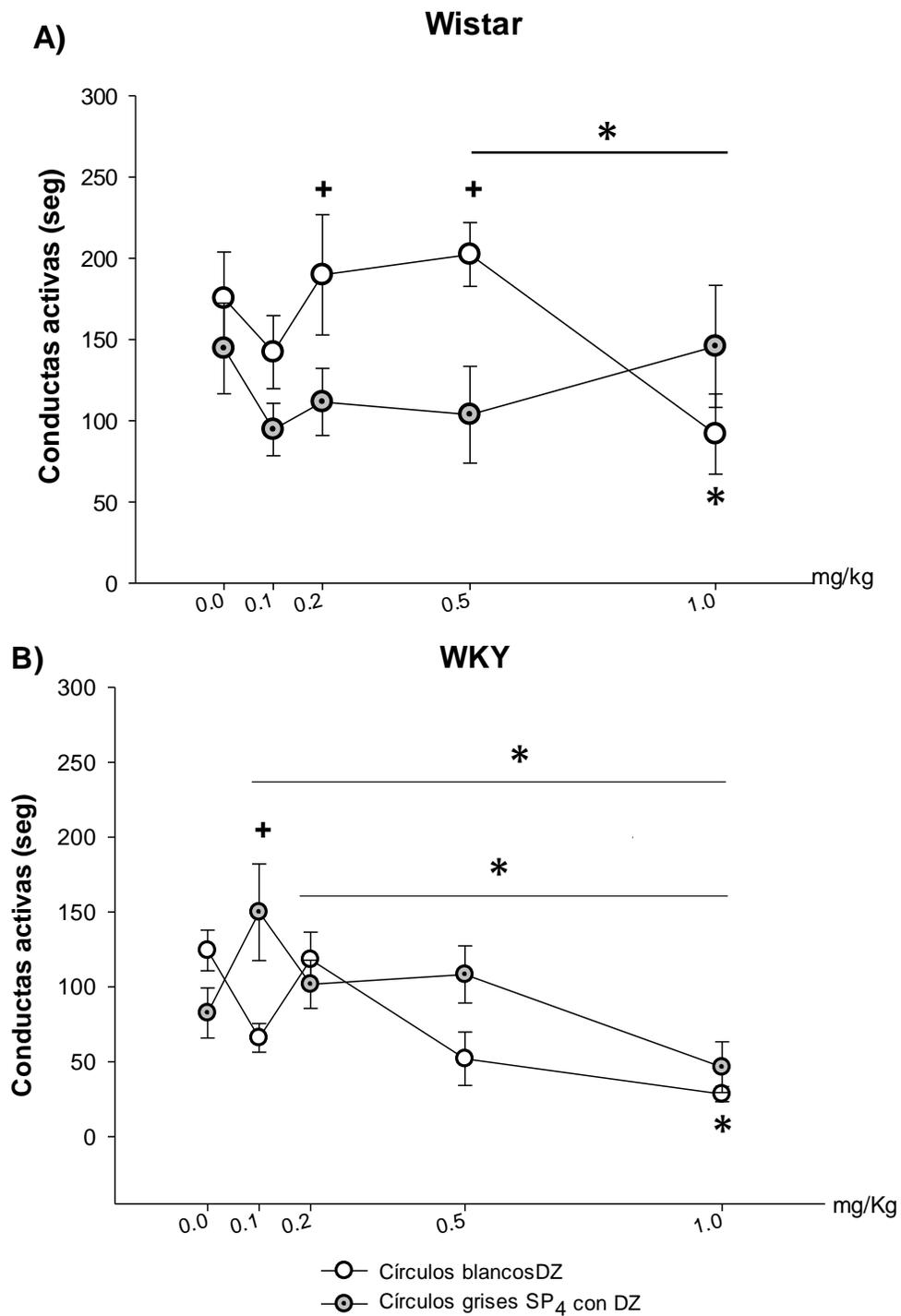


La **Figura 4**. Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP₄ con DZ) sobre la permanencia en brazos cerrados en el modelo de laberinto elevado en cruz (LEC) en ratas Wistar A) *p≤0.005= vs vehículo y 0.25 mg/kg vs 0.125 mg/kg; + p≤0.005= DZ vs SP₄ con DZ y WKY B) *p<0.05. La prueba post-hoc Holm-Sidak.

8.2 Modelo de enterramiento defensivo

En las ratas W la administración de 1.0 mg/Kg DZ disminuyó el tiempo de conductas activas vs su vehículo ($p=0.04$) y en las dosis 1.0 mg/Kg vs 0.5 mg/Kg ($p=0.047$) respectivamente. Sin embargo al combinarse con la condición hormonal perdió su efecto. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento $F: 1, 66= 5.73, p<0.019$; para el factor dosis $F: 4, 66=1.11, ns$; para la interacción $F: 4, 66=2.24, p=0.07$. El análisis post-hoc mostró diferencias significativas al comparar el grupo de DZ vs SP₄ con DZ, en las dosis 0.25 mg/Kg, ($p<0.043$) y 0.5 mg/Kg, ($p<0.009$) (**Figura 5 A**).

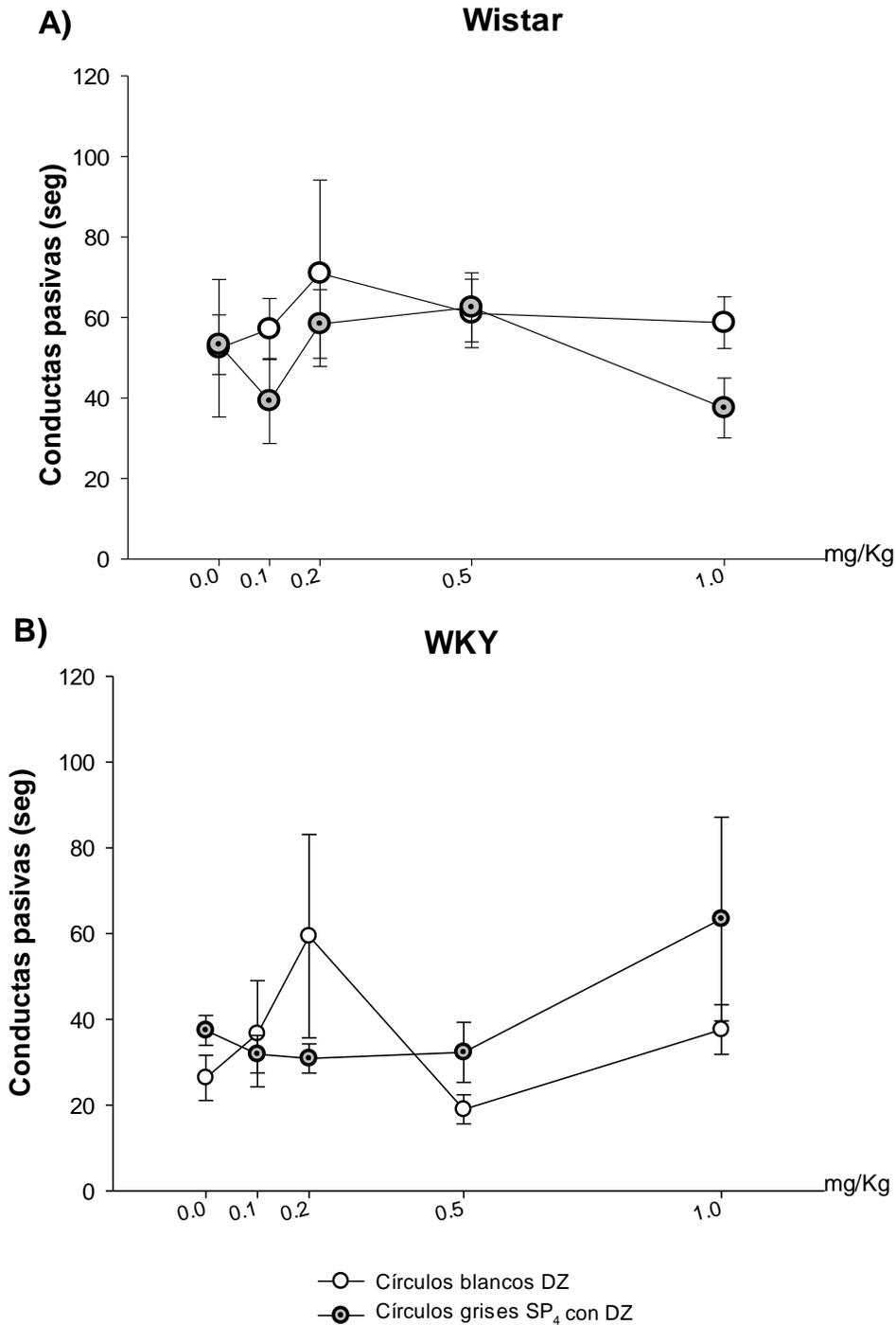
En las ratas WKY el DZ disminuyó el tiempo de las conductas activas a la dosis de 1.0 mg/Kg vs su vehículo ($p= 0.02$) y vs 0.25 mg/Kg ($p=0.47$). Los grupos a los que se les indujo SP₄ con DZ, no se observó el efecto ansiolítico del DZ al compararse contra el vehículo; sin embargo cuando se comparó la dosis de 1.0 mg/kg vs 0.125 mg/kg se observó la disminución de las conductas activas ($p=0.005$). El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento $F: 1, 52= 2.49, ns$; para el factor dosis $F: 4, 52=4.29, p=0.004$; para la interacción $F: 4, 52=3.60, p=0.011$. El análisis post-hoc mostró diferencias significativas al comparar el grupo de DZ vs SP₄ con DZ en la dosis 0.125 mg/Kg, ($p<0.001$) (**Figura 5 B**).



La **Figura 5**. Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP₄ con DZ) sobre las conductas activas en el modelo de enterramiento defensivo (ED) en ratas Wistar A) *p≤0.05 = vs el vehículo, 0.5 vs 1.0 mg/Kg; +p≤0.05=DZ vs SP₄ con DZ, y WKY B) *p≤ 0.05 vs su vehículo, 1.0 vs 0.25 y 1.125 mg/Kg; +DZ vs SP₄ con DZ p≤ 0.005. La prueba post-hoc Holm-Sidak

En los animales W tratados con DZ ó SP₄ con DZ, no se observó que modificara las conductas pasivas independientemente de la dosis. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: 1, 66= 1.80, p=0.18; para el factor dosis F: 4,66=0.87, p=0.48; para la interacción F: 4,66,=0.41, p=0.8 (**Figura 6 A**).

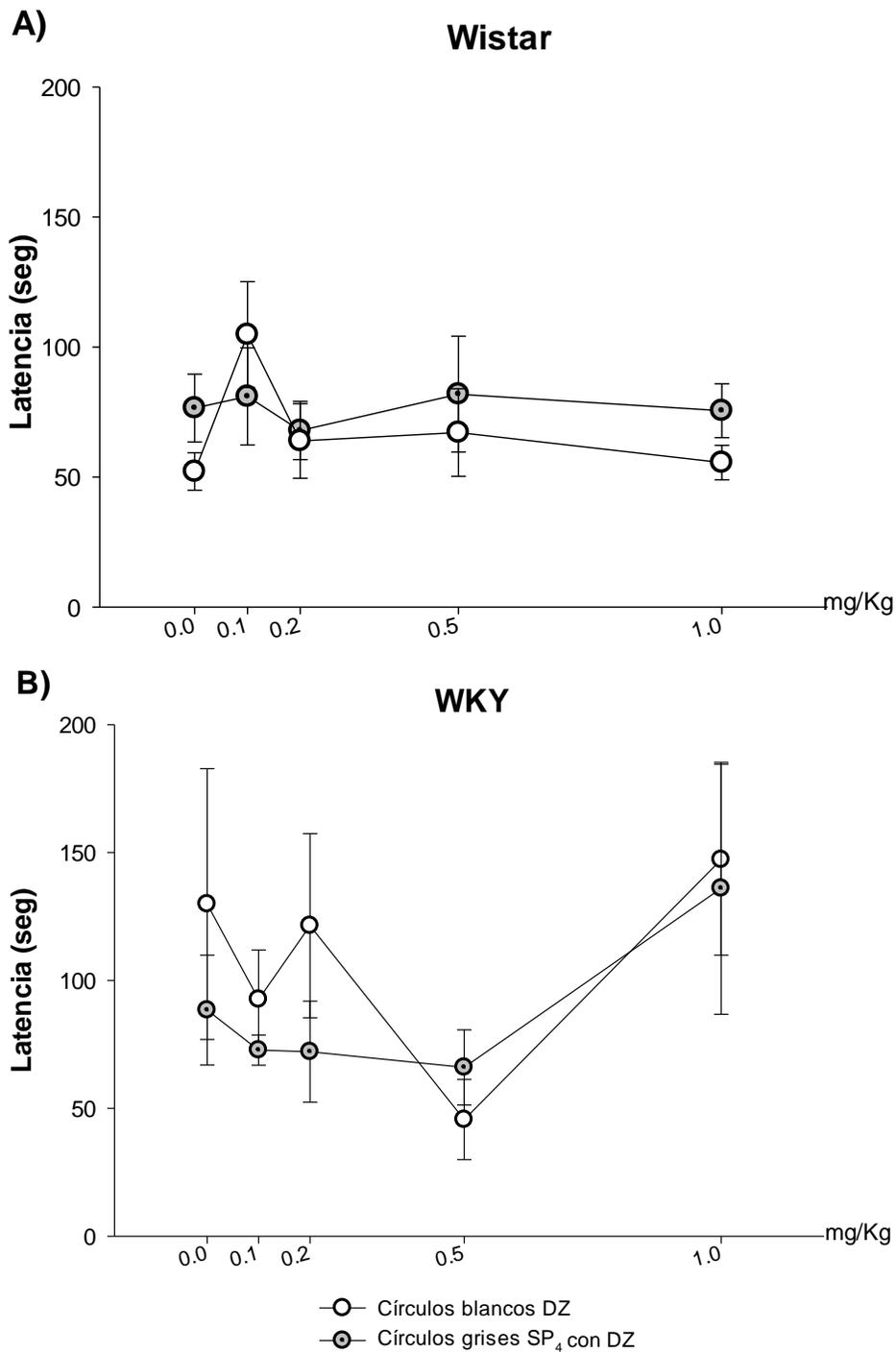
A ratas WKY la administración de DZ o SP₄ con DZ, no mostraron cambios significativos en las conductas pasivas en ninguna de las dosis. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: 1,52=0.23, p=0.62; para el factor dosis F: 4,52=1.60, p=0.18; para la interacción F: 4,52=1.78, p=0.14 (**Figura 6 B**).



La **Figura 6**. Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP₄ con DZ) sobre las conductas pasivas en el modelo de enterramiento defensivo (ED) en ratas Wistar A) *p<0.05 y WKY. B) *p<0.05. La prueba post-hoc Holm-Sidak

Al analizar las ratas W la administración de DZ ó SP₄ con DZ, no mostró cambios significativos en la latencia a la conducta de enterramiento en ninguna de las dosis evaluadas. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: 1,66=0.64, p=0.42; para el factor dosis F: 4,66=1.24, p=0.29; para la interacción F: 4,66=0.80, p=0.52 (**Figura 7 A**).

En el grupo de las ratas WKY la administración de DZ ó SP₄ con DZ, no promovió cambios en la latencia a ninguna de las dosis evaluadas. El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: 1,52=1.24, p=0.26; para el factor dosis F: 4,52=2.66, p=0.07; para la interacción F: 4,52=4.45, p=0.77 (**Figura 7 B**).



La **Figura 7**. Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona con diazepam (SP₄ con DZ) sobre la Latencia en el modelo de enterramiento defensivo (ED) en ratas Wistar A) *p<0.05 y WKY. B) *p<0.05. La prueba post-hoc Holm-Sidak

En el **cuadro III y IV**, se muestra el efecto de diferentes dosis de DZ en animales control y los que fueron sometidos al esquema de SP₄ con DZ, sobre las variables de erguimientos, exploración al electrodo y el número de choques recibidos evaluados en el modelo de ED en ratas W y WKY.

En las ratas W no se observaron modificaciones en los erguimientos independientemente del tratamiento de DZ o SP₄ con DZ. El análisis pos-hotc mostro en la dosis de 1.0 mg/Kg, disminuyó el número de erguimientos al comparar DZ con el grupo SP₄ con DZ, ($p=0.015$). El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: $1,52=1.24$, $p=0.26$; para el factor dosis F: $4,52=2.66$, $p=0.07$; para la interacción F: $4,52=4.45$, $p=0.77$ (**Cuadro III.**).

Las ratas WKY la administración de DZ no modificó el número de erguimientos en ninguna de las dosis ensayadas. En el grupo tratado con SP₄ con DZ, se observó la reducción del número de erguimientos con la dosis de 1.0 mg/Kg vs su vehículo ($p=0.020$). El ANOVA de dos vías mostró los siguientes valores para el tratamiento F: $1,52=5.43$, $p=0.24$; para el factor dosis F: $4,52=3.74$, $p=0.009$; para la interacción F: $4,52=0.66$, $p=0.62$ (**Cuadro IV.**)

En relación a la conducta de exploración al electrodo y la variable de número de choques, no se observaron diferencias significativas por dosis, grupo o tratamiento en ninguna de las dos cepas ver **cuadro III y IV**.

Cuadro III. Efecto del DZ y SP₄ con DZ, en ratas W. Sobre las conductas erguimiento, exploración al electrodo y número de choques recibidos en el modelo de enterramiento defensivo ED.

	Control	0.125	0.25	0.5	1.0
Erguimientos					
DZ	20.0 ± 2.2	19.9 ± 1.8	19.4 ± 2.0	17.9 ± 2.1	18.7 ± 1.9+
SP ₄ con DZ	21.6 ± 2.9	22.6 ± 2.4	22.6 ± 2.6	19.9 ± 2.4	27.7 ± 2.9
Exploración al electrodo					
DZ	4.8 ± 0.6	5.9 ± 0.6	4.7 ± 0.7	3.9 ± 0.5	4.6 ± 0.8
SP ₄ con DZ	5.0 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.70	5.0 ± 0.5	5.2 ± 0.4
No. De Choques recibidos					
DZ	3.1 ± 0.4	4.1 ± 0.5	3.6 ± 0.4	4.3 ± 0.6	2.7 ± 0.3
SP ₄ con DZ	4.1 ± 0.8	4.5 ± 1.1	3.3 ± 0.5	3.1 ± 0.5	3.3 ± 0.2
Los datos son de 6-8 animales por grupo y se expresan como la Media ± E.E. +DZ vs SP ₄ con DZ p=0.05					

Cuadro IV. Efecto del DZ y SP₄ con DZ, en ratas WKY. Sobre las conductas erguimiento, exploración al electrodo y número de choques recibidos en el modelo de enterramiento defensivo ED.

	Control	0.125	0.25	0.5	1.0
Erguimientos					
DZ	17.0 ± 2.0	15.9 ± 1.9	14.4 ± 1.8	13.2 ± 4.0	12.4 ± 1.9
SP ₄ con DZ	23.6 ± 2.6	20.5 ± 1.5	18.8 ± 2.0	14.6 ± 2.6	12.2 ± 1.8*
Exploración al electrodo					
DZ	4.0 ± 0.5	5.0 ± 0.6	5.8 ± 0.6	5.4 ± 0.7	5.6 ± 0.4
SP ₄ con DZ	6.2 ± 1.3	5.6 ± 0.3	5.9 ± 0.6	5.0 ± 0.7	6.4 ± 0.7
No. De Choques recibidos					
DZ	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.4
SP ₄ con DZ	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4
Los datos son de 6-8 animales por grupo y se expresan como la Media ± E.E. *p=0.05 comparada con el grupo testigo					

8. 3 Campo abierto

En los animales W ninguna de las dosis de DZ o SP₄ con DZ, modificó la variable de cruces totales en el campo abierto (**Cuadro V**).

Cuando se analizó la respuesta en las ratas WKY no se observaron cambios en la variable de cruces totales en el campo abierto con ninguno de los tratamientos ensayados (**Cuadro VI**).

Cuadro V. Efecto del DZ y SP ₄ con DZ, en ratas Wistar. Sobre la conducta de campo abierto.					
Campo Abierto	Control	0.125	0.25	0.5	1.0
DZ	25.1 ± 2.0	23.4 ± 1.9	26.6 ± 2.1	21.0 ± 2.4	26.9 ± 2.2
SP ₄ con DZ	24.8 ± 2.1	26.1 ± 2.4	26.9 ± 3.6	24.5 ± 2.8	27.0 ± 1.9

Los datos son de 7-8 animales por grupo y se expresan como la Media ± E.E.

Cuadro VI. Efecto del DZ y SP ₄ con DZ, en ratas WKY. Sobre la conducta de campo abierto.					
Campo Abierto	Control	0.125	0.25	0.5	1.0
DZ	20.2 ± 0.7	19.6 ± 1.6	21.8 ± 2.4	22.0 ± 2.7	18.6 ± 1.4
SP ₄ con DZ	19.4 ± 0.8	20.4 ± 1.3	21.4 ± 1.5	21.6 ± 1.3	23.8 ± 1.7

Los datos son de 5-8 animales por grupo y se expresan como la Media ± E.E.

9. DISCUSIÓN

El DZ aumentó el tiempo en los brazos abiertos en el LEC en la cepa W pero no en la WKY. Se considera que el incremento en el tiempo de exploración en brazos abiertos es indicativo de una menor ansiedad (Lister, 1987), por lo que en la cepa W el DZ produjo un efecto tipo ansiolítico. Este resultado concuerda con reportes previos utilizando la misma cepa (Fernández-Guasti y Picazo, 1997; Fernández-Guasti *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998; Gulinello *et al.*, 2002) pero contrasta con los resultados obtenidos con la cepa WKY. Una posible explicación a la falta de respuesta al DZ es la sobre-activación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal característico de la cepa WKY (De la Garza y Mahoney, 2004), ya que presenta concentraciones elevadas de corticosterona en comparación a otras cepas (Rittenhouse *et al.*, 2002). En apoyo a esta idea, se ha reportado que el efecto ansiolítico del DZ se pierde en un modelo de diabetes caracterizado por mayores concentraciones de corticosterona y el efecto del DZ se restablece con la administración de antagonistas a receptores a mineralocorticoides y glucocorticoides (López-Rubalcava *et al.*, 2013). Esto sugiere que la sensibilidad al DZ pudiera depender de la cantidad de glucocorticoides presentes.

En el modelo de enterramiento defensivo el DZ redujo las conductas activas en ambas cepas, sugiriendo un efecto tipo ansiolítico. Nuestros resultados con la cepa W coinciden a lo reportado por otros grupos (Fernández-Guasti y Picazo 1997; Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2003) y es el primer reporte en donde se evalúa el efecto del DZ en la cepa WKY. Un dato a resaltar en la cepa WKY, es que el principal indicador de la conducta de ansiedad es el tiempo invertido en las conductas pasivas, *freezing* e inmovilidad, y que esta muestra menor conducta de enterramiento en condiciones basales (Paré, 1992; Rogel-Salazar y López-Rubalcava, 2011). Es posible esperar, que el DZ disminuyera el tiempo invertido en la conducta pasiva, hecho que no se observó. Dado que el principal indicador de ansiedad en esta cepa no se modificó es posible que el efecto ansiolítico del DZ sea un “falso positivo”, debido a deficiencias en la coordinación motriz

provocando que la rata no entierre y por ello, se reduzca el tiempo de enterramiento. Es importante señalar que no se realizó una prueba para evaluar la coordinación, sin embargo se observó una marcada tendencia a reducir el número de erguimientos ($p=0.07$ vs su control). Al momento no hay antecedentes que nos indiquen el efecto del DZ en esta cepa, por lo que resultaría de interés evaluar a profundidad, si hay un efecto ansiolítico o no del DZ y si existe diferencia en la sensibilidad de los modelos (LEC y ED).

La administración de DZ en animales sometidos al esquema de supresión de progesterona (SP_4) carece de efecto ansiolítico en ambas cepas en el LEC y en el ED. Este resultado coincide con lo reportado por otros grupos utilizando el LEC (Smith *et al.*, 2006). Se ha reportado que la supresión brusca de progesterona incrementa la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor $GABA_A$ (Gulinello *et al.*, 2001), lo que disminuye la sensibilidad a las BDZ como el lorazepam (Gulinello *et al.*, 2002). El incremento en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor $GABA_A$ se ha vinculado al incremento de la vulnerabilidad para desarrollar ansiedad (Gulinello *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Dado la falta de respuesta del DZ en animales a los que se les indujo la supresión brusca de progesterona, es posible que en las ratas W la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor $GABA_A$ hubiera cambiado y con ello, la sensibilidad al DZ, lo que permitiría explicar la falta de respuesta ansiolítica.

Por el contrario, en la cepa WKY, no se observó el efecto ansiolítico del DZ en los animales control ni en los que estuvieron bajo el esquema de supresión de progesterona. En estudios no publicados de nuestro grupo, se encontró el incremento de la unión de [3H] flunitrazepam a los receptores $GABA_A$ en el hipocampo y la amígdala de ratas WKY sometidas al mismo esquema de abstinencia a progesterona (Sollozo-Dupont, datos no publicados). Así mismo, Lei *et al.*, (2009) reportaron que la WKY presenta mayor unión al receptor $GABA_A$ en el hipocampo y amígdala. Es posible que el incremento de la unión al $GABA_A$ también este asociado a cambios en la sensibilidad del receptor que conduzcan a

una respuesta pobre o nula al DZ. Hay reportes que indican un menor tono GABérgico en algunas regiones del cerebro como el *locus coeruleus* en la cepa WKY (Bruzos-Cidón *et al.*, 2015). Se requieren experimentos específicos que muestren si existen alteraciones en la expresión de las subunidades del receptor GABA_A, así como de la funcionalidad de este receptor en la cepa WKY.

Por otro lado, se observó que la cepa WKY presenta menor actividad en general que la W independientemente del tratamiento. Nuestros resultados concuerdan con estudios que muestran que las ratas WKY tienen niveles bajos de conducta de enterramiento, conducta exploratoria y mayor inmovilidad en comparación con otras cepas (Paré, 1992; Paré y Redei, 1993). Paré (2000) reporta que la cepa exhibe menos comportamientos exploratorios con la reducción de interés ante un estímulo novedoso lo que ha llevado a otros autores a sugerir que las ratas WKY muestran una inhibición de la conducta ante el reto (McAuley *et al.*, 2009). Dado que el eje adrenal regula la respuesta conductual de alarma ante el estrés (Gómez-González y Escobar, 2002) y éste se encuentra desregulado en la cepa WKY (Rittenhouse *et al.*, 2002; De la Garza y Mahoney, 2004), es posible que las conductas pasivas que se manifiestan en esta cepa se deban a la inadecuada regulación del eje adrenal ante el estrés.

La cepa W y la WKY no mostraron diferencias en el número de cuadros cruzados independientemente de la condición y del tratamiento. Este resultado confirma que no se presentó una alteración motora que afectara el desempeño del animal en los dos modelos experimentales, el LEC y el ED, por lo que los resultados de las pruebas son específicos para la conducta tipo ansiedad.

10. CONCLUSIONES

1. En ratas W el diazepam no induce efecto ansiolítico con supresión brusca de progesterona.
2. En ratas WKY el diazepam carece de efecto ansiolítico independientemente del tratamiento hormonal.
3. En ratas W el modelo de laberinto elevado en cruz es más sensible para detectar el efecto ansiolítico del diazepam que el modelo de enterramiento defensivo.

11. PERSPECTIVA

- ❖ Analizar las diferencias y similitudes entre las cepas en respuestas conductuales que ayuden a facilitar el entendimiento de la etiología de los trastornos de tipo ansioso en hembras.

12. BIBLIOGRAFÍA

- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th Ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Bandelow B, Lichte T, Rudolf S, Wiltink J, Beutel ME. (2014). The diagnosis of and treatment recommendations for anxiety disorders. *Dtsch Arztebl Int.* 111:473-480.
- Bautista RC, Castillejos CC, Gutiérrez GJA, Hernández VJMV, Martínez MC, Rojas CS, Roldan RP, Sánchez SL, Solano CE, Zavala CR. (2006). Manual de prácticas de laboratorio de investigación formativa III. Ed. UNAM. México, DF. pp125
- Beidel DC, Turner SM, Morris TL. (1999). Psychopathology of childhood social phobia. *J Am Acad Child & Adolest Psychiat.* 38:643-650.
- Biggs WS, Demunth RH. (2011). Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. *Am Fam Physician.* 84:918-924.
- Bouton ME, Mineka S, Barlow DH. (2001). A modern learning theory perspective on the etiology of panic disorder. *Psychol Rev.* 108:4-32.
- Bruzos-Cidón C, Llamosas N, Ugedo L, Torrecilla M. (2015). Dysfunctional inhibitory mechanisms in locus coeruleus neurons of the wistar Kyoto rat. *Int J Neuropsychopharmacol.* 18:pyu122
- Cárdenas J, Navarro JF. (2002). Modelos animales de ansiedad condicionada (II). *Psiqu Biol.* 9:68-76
- Cantarow A, Schepartz B. (1989). Bioquímica. 4ª Edición Editorial Interamericana S. A de C.V. México, DF. pp. 661-695.
- Cassano P, Argibay P. (2009). La enfermedad depresiva y sus modelos animales. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires.* 29:117-120.
- Cunningham J, Yonkers KA, O'Brien S, Eriksson E. (2009). Update on research and treatment of premenstrual dysphoric disorder. *Harv Rev Psychiatry.* 17:120-137.

- Dickerson LM, Mazyck PJ, Hunter MH. (2003). Premenstrual syndrome. *Am Fam Physician*. 67:1743-1752.
- De Boer SF, Koolhaas JM. (2003). Defensive burying in rodents: Ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol*. 463:145-161.
- De La Garza R, James J, Mahoney JJ. (2004). A distinct neurochemical profile in WKY rats at baseline and in response to acute stress: implications for animal models of anxiety and depression. *Brain Research*. 1021:209-218
- Estrada-Camarena E, Sollozo-DuPont I, Islas-Preciado D, López-Rubalcava C. (2011). Chapter 6: Role of hypothalamic-pituitary-gonadal/adrenal axis in the premenstrual syndrome. In: *Psychoneuroendocrinology*. De Gortari (Ed). Research Signpost. México. pp 115-130.
- Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L. (2003). Orchidectomy sensitizes male rats to the action of diazepam on burying behavior latency: role of testosterone. *Pharmacol Biochem Behav*. 75:473-479.
- Fernández-Guasti A, Martínez-Mota L, Estrada-Camarena E, Contreras CM, López-Rubalcava C. (1999). Chronic treatment with desipramine induces an estrous cycle-dependent anxiolytic-like action in the burying behavior, but not in the elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav*. 63:13-20.
- Fernández-Guasti A, Picazo O. (1997). Anxiolytic actions of diazepam, but not of buspirone, are influenced by gender and the endocrine stage. *Behav Brain Res*. 88:213-218.
- Firoozi R, Kafi M, Salehi I, Shirmohammadi M. (2012). The Relationship between Severity of Premenstrual Syndrome and Psychiatric Symptoms. *Iran J Psychiatry*. 7:36-40.
- Freeman EW. (2003). Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: definitions and diagnosis. *Psychoneuroendocrinology*. 28 Suppl 3:25-37.
- Freeman ME. (1994). The neuroendocrine control of the rat estrus cycle. En: *The physiology of reproduction*. Editores: Knobil E y Neild JD. 2° Ed, V. 2 cap 46, Raven Press, New York. pp 613-658

- Gallo MA, Smith SS. (1993). Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 46:897-904.
- Girdler SS, Straneva PA, Light KC, Pedersen CA, Morrow AL. (2001). Allopregnanolone levels and reactivity to mental stress in premenstrual dysphoric disorder. *Biol Psychiatry.* 49:788-797.
- Gries DA, Condouris GA, Shey Z, Houpt M. (2005). Anxiolytic-like action in mice treated with nitrous oxide and oral triazolam or diazepam. *Life Sci.* 76:1667-1674.
- Gulinello M, Gong QH, Li X, Smith SS. (2001). Short-term exposure to a neuroactive steroid increases alpha4 GABA (A) receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res.* 910:55-66.
- Gulinello M, Gong QH, Smith SS. (2002). Progesterone withdrawal increases the alpha4 subunit of the GABA (A) receptor in male rats in association with anxiety and altered pharmacology - a comparison with female rats. *Neuropharmacology.* 43:701-714.
- Gulinello M, Smith SS. (2003). Anxiogenic Effects of Neurosteroid Exposure: Sex Differences and Altered GABAA Receptor Pharmacology in Adult Rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 305:541-548.
- Gutiérrez-García AG, Contreras CM. (2013). Anxiety: An Adaptive Emotion, *New Insights into Anxiety Disorders*, Dr. Federico Durbano (Ed.), ISBN: 978-953-51-1053-8, In Tech, DOI: 10.5772/53223. Available from: <http://www.intechopen.com/books/new-insights-into-anxiety-disorders/anxiety-an-adaptive-emotion>
- Guyton CG y Hall JE. (2011). *Tratado de Fisiología Médica.* 12^a ed. Ed. Elsevier España. pp543-545
- Gómez-González B y Escobar A. (2002). Neuroanatomía del Estrés. *Rev Mex Neuroci.* 3:273-282
- Hurlé MA. (2012). *Farmacología Humana.* Masson. Barcelona España. pp 453-467

- Informe de la Evaluación del Sistema de Salud Mental en México utilizando el Instrumento de Evaluación para el Sistema de Salud Mental de la Organización Mundial de la Salud (IESM-OMS). México 2011.
- Kalueff AV, Tuohimaa P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods*. 143:169-177.
- Kilen SM, Schwartz NB. (1998) "Estrus Cycle". En: *Encyclopedia of reproduction*. Ed Knobil E, Nelly JD. Academic Press. USA. 2: 127-136
- Lei Y, Yaroslavsky I, Tejani-Butt SM. (2009). Strain differences in the distribution of N-methyl-D-aspartate and gamma (gamma) aminobutyric acid-Areceptors in rat brain. *Life Sci*. 85:794-799.
- Lister RG. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92:180-185
- Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Lundgren P, Bäckström T. (2006). Progesterone withdrawal effects in the open field test can be predicted by elevated plus maze performance. *Horm Behav*. 50:208-215.
- Löfgren M, Johansson IM, Meyerson B, Turkmen S, Bäckström T. (2009). Withdrawal effects from progesterone and estradiol relate to individual risk-taking and explorative behavior in female rats. *Physiol Behav*. 96:91-97.
- López-Rubalcava C, Paez-Martinez N, Oikawa J. (2013). Blockade of corticosteroid receptors induces anxiolytic-like effects in streptozotocin-induced diabetic mice, and synergizes with diazepam. *Behav Pharmacol*. 24:320-327.
- Marván MA, Contraeras MC. (1993). El síndrome premenstrual. *Salud Ment*. 16: 33-38.
- Miranda DA, Conde CA, Celis CC, Corzo SP. (2009). Modelado del comportamiento de ratas en laberinto en cruz elevado basado en redes neuronales artificiales. *Rev. Col. Fis*. 41:406-408
- McAuley JD, Stewart AL, Webber ES, Cromwell HC, Servatius RJ, Pang KC. (2009) Wistar-Kyoto rats as an animal model of anxiety vulnerability: support for a hypervigilance hypothesis. *Behav Brain Res*. 204:162-168.

- Moreno-Peral P, Conejo-Cerón S, Motrico E, Rodríguez-Morejón A, Fernández A, García-Campayo J, Roca M, Serrano-Blanco A, Rubio-Valera M, Bellón JÁ.(2014). Risk factors for the onset of panic and generalised anxiety disorders in the general adult population: a systematic review of cohort studies. *J Affect Disord.*168:337-348.
- Nillni YI, Toufexis DJ, Rohan KJ. (2011). Anxiety sensitivity, the menstrual cycle, and panic disorder: a putative neuroendocrine and psychological interaction. *Clin Psychol Rev.* 31:1183-1191.
- Olsen RW, Tobin AJ. (1990). Molecular biology of GABAA receptors. *FASEB J.* 4:1469-1480.
- Paré W. (1992). The performance of WKY rats on three tests of emotional behavior. *Physiol Behav.* 51:1051-1056.
- Paré W, Redei E. (1993). Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiology and Behaviors.* 54: 1179-1185
- Paré WP. (2000). Investigatory behavior of a novel conspecific by Wistar Kyoto, Wistar and Sprague-Dawley rats. *Brain Res Bull.* 53:759-765.
- Pinel J and Treit, D. (1978). Defensive burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 92:708-712.
- Purves (2004) *Neurociencia.* 3ra. Edición. Ed. Panamericana México D.F. pp. 855.
- Réus GZ, Dos Santos MA, Abelaira HM, Quevedo J. (2014). Animal models of social anxiety disorder and their validity criteria. *Life Sci.* 114:1-3.
- Rittenhouse PA, López-Rubalcava C, Stanwood GD, Lucki I. (2002). Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology.*27:303-318.
- Rodríguez-Landa JF, Contreras CM. (1998). Algunos datos recientes sobre la Fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Rev Biomed.* 9:181-191.
- Rogel-Salazar G, López-Rubalcava C. (2011). Evaluation of the anxiolytic-like effects of clomipramine in two rat strains with different anxiety vulnerability (Wistar and Wistar-Kyoto rats): participation of 5-HT1A receptors. *Behav Pharmacol.* 22:136-46.

- Saavedra M, Contreras CM, Azamar-Arizmendi G, Hernández-Lozano M. (2006). Differential progesterone effects on defensive burying and forced swimming tests depending upon a gradual decrease or an abrupt suppression schedules. *Pharmacol Biochem Behav.* 83:130-5.
- Scaini S, Belotti R, Ogliari A. (2014). Genetic and environmental contributions to social anxiety across different ages: A meta-analytic approach to twin data. *J Anxiety Disord.*28: 650-656.
- Smith SS, Gong QH, Hsu FC, Markowitz RS, Ffrench-Mullen JM, Li X. (1998). GABA (A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature.* 392:926-930.
- Smith SS, Ruderman Y, Hua Gong Q, Gulinello M. (2004). Effects of a low dose of ethanol in an animal model of premenstrual anxiety. *Alcohol.* 33:41-49.
- Smith SS, Ruderman Y, Frye C, Homanics G, Yuan M. (2006). Steroid withdrawal in the mouse results in anxiogenic effects of 3alpha, 5beta-THP: a possible model of premenstrual dysphoric disorder. *Psychopharmacology (Berl).*186:323-333.
- Sollozo-Dupont MS, Estrada Camarena E, López-Rubalcava C. (2011) Medicina tradicional: estudios preclínicos de plantas con propiedades ansiolíticas. *El residente.* 6:78-84
- Staley K, Scharfman H. (2005). A woman's prerogative. *Nat Neurosci.* 8:697-699.
- Su TP, Schmidt PJ, Danaceau M, Murphy DL, Rubinow DR. (1997). Effect of menstrual cycle phase on neuroendocrine and behavioral responses to the serotonin agonist m-chlorophenylpiperazine in women with premenstrual syndrome and controls. *J Clin Endocrinol Metab.*82:1220-1228.
- Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. (2006). *The laboratory rat.* 2da. Edición ed. Elsevier Amsterdam pp. 211
- Sundström I, Nyberg S, Bäckström T. (1997). Patients with premenstrual syndrome have reduced sensitivity to midazolam compared to control subjects. *Neuropsychopharmacology.* 17:370–381

- Tresguerres JAF. (2011) "Fisiología Humana". 4ta ed. Ed McGraw Hill, México. pp 1041-1057.
- Virgen R, Lara AC, Morales G, Villaseñor S. (2005). Los trastornos de ansiedad. Rev Dig Univ. 6:2-11.
- Yonkers KA. (1997). Anxiety symptoms and anxiety disorders: how are they related to premenstrual disorders? J Clin Psychiatry. 58 Suppl 3:62-67

13. ANEXO

i. Listado de abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza
BDZ	Benzodicepinas
CA	Campo abierto
ED	Enterramiento defensivo
DZ	Diazepam
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA _A -R	Receptor del ácido γ -aminobutírico
GnRH	Hormona liberadora de la gonadotropina
HHA	Eje hipotálamo hipófisis adrenal
LEC	Laberinto elevado en cruz
LH	Hormona luteinizante
P ₄	Progesterona
MED	Modelo de enterramiento defensivo
SNC	Sistema nervioso central
SP ₄	Supresión de progesterona
SPM	Síndrome premenstrual
TDPM	Trastorno disfórico premenstrual
W	Wistar
WKY	Wistar kyoto

ii. Listado de cuadros

Cuadro I	Síntomas asociados con el síndrome premenstrual (SPM) y el trastorno disfórico premenstrual (TDPM)
Cuadro II	Criterios clínicos para el trastorno disfórico premenstrual
Cuadro III	Efecto del DZ y SP ₄ con DZ en ratas W. Sobre las conductas erguimiento, exploración al electrodo y número de choques recibidos en el modelo de enterramiento defensivo
Cuadro IV	Efecto del DZ y SP ₄ con DZ en ratas WKY. Sobre las conductas erguimiento, exploración al electrodo y número de choques recibidos en el modelo de enterramiento defensivo.
Cuadro V	Efecto del DZ y SP ₄ con DZ en ratas W. Sobre la conducta de campo abierto
Cuadro VI	Efecto del DZ y SP ₄ con DZ en ratas WKY. Sobre la conducta de campo abierto.

iii. Listado de figuras

- Figura 1 Comparación del ciclo estral de la rata y el ciclo menstrual de la mujer
- Figura 2 Estructura química de la benzodiazepina
- Figura 3 Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP_4 con DZ) sobre la permanencia en brazos abiertos en el modelo de laberinto elevado en cruz (LEC) en ratas W y WKY
- Figura 4 Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP_4 con DZ) sobre la permanencia en brazos cerrados en el modelo de laberinto elevado en cruz (LEC) en ratas W y WKY
- Figura 5 Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP_4+DZ) sobre las conductas activas en el modelo de enterramiento defensivo (ED) en ratas W y WKY
- Figura 6 Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP_4+DZ) sobre las conductas pasivas en el modelo de enterramiento defensivo (ED) en ratas W y WKY
- Figura 7 Curva dosis respuesta de diazepam (DZ) y supresión de progesterona (SP_4+DZ) sobre la latencia en el modelo de enterramiento defensivo (ED) en ratas W y WKY

iv. Diagrama

- Diagrama 1 Diseño experimental de grupos a tratar

No se piensa en el verano cuando cae la nieve

Paisaje-Vicentino