



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Hiperexcitabilidad neuronal inducida
por la abstinencia a Diazepam:
Estudio electrofisiológico, farmacológico,
y conductual”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A

GERARDO DAVID ANAYA EUGENIO



DIRECTOR

DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

México D.F., Septiembre 2008

TESIS APOYADA POR EL CONACYT (PROYECTO: 49439M/24472)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

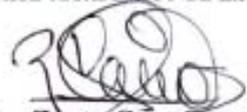
Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Hiperexcitabilidad neuronal inducida por la abstinencia a Diazepam: estudio electrofisiológico, farmacológico y conductual"

realizado por **Anaya Eugenio Gerardo David** con número de cuenta **3-0019488-1** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez	
Propietario	Dr. César Casasola Castro	
Propietario Tutor	Dr. Jaime Eduardo Calixto González	
Suplente	M. en C. José Luis Arreola Ramírez	
Suplente	Quím. Clin. Edgar Flores soto	

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 02 de julio de 2008
EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA


DR. ZENÓN CANO SANTANA



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

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por darme el tiempo de vida para llevar a cabo este objetivo.

Esta tesis se la dedico a mis padres, como agradecimiento por el apoyo incondicional brindado durante todos los años de estudio, no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio, esfuerzo y amor que me brindaron, ustedes quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, no podré pagar todos sus desvelos ni aún con la riquezas mas grandes del mundo. Con cariño admiración a:

Lilia Eugenio Andraca

Y

Marcos Nava García

A mis hermanos por el apoyo, los consejos y opiniones que ayudaron a formarme, y por compartir y convivir bajo el mismo techo, gracias:

Yanet Anaya Eugenio

Diana Laura Nava Eugenio

Marcos Oscar Nava Eugenio

Sin los consejos de cada uno de mis amigos no hubiera podido terminar esta Tesis, es por esos que les agradezco cada momento que pasamos juntos porque estuvieron ahí cuando los necesite. A **Uri Nimrod Ramírez Jarquín, Francisco Suárez Escamilla y Castañeda Huitrón Ana Laura** por ser los mejores amigos que alguien pudiera tener y con quienes he compartido muchos momentos que siempre llevare en mi corazón.

También a todos y cada uno de los compañeros que me apoyaron desde que inicie este camino.

A **Karina Simón Arceo** por apoyarme y estar en momentos muy importantes durante la realización de esta tesis

A los integrantes del laboratorio de neurobiología del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, **Rosendo del Ángel** y **Areli Huanosta**.

A mis profesores, que compartieron conmigo sus conocimientos y su amor por la Biología.

Y claro a mi asesor, **Dr. Eduardo Calixto González** por haberme tenido paciencia hasta el final, le agradezco la formación y los consejos que me ayudaron a realizar este trabajo.



El presente trabajo de Tesis
fue realizado en el laboratorio de Neurobiología de la División de
investigaciones en Neurociencias del
Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente"

Muchas Gracias

Con agradecimiento a los revisores de la presente Tesis

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez
Dr. César Casasola C
Dr. Eduardo Calixto G
M. en C. José Luis Arreola R
Lic. en Quim. Clin. Edgar Flores S

México D.F., septiembre 2008

TESIS APOYADA POR EL CONACYT (PROYECTO: 49439M/24472)



I Índice		Página
I	Índice	4
	Lista de abreviaturas	6
II	Introducción	7
1.-	Sistema inhibitor GABAérgico	
	1.1 El GABA, síntesis y metabolismo	9
	1.2 Recaptura del GABA	12
	1.3 Fisiología del sistema GABAérgico	13
	1.4 El receptor GABA _B	14
	1.5 El receptor GABA _A	15
	1.6 Modulación del GABA _A	17
	1.7 Distribución del GABA _A en el SNC	18
2.-	Síndromes de abstinencia asociados con la neurotransmisión GABAérgica	21
	2.1 Tolerancia y dependencia	22
	2.2 Abstinencia a Barbitúricos	24
	2.3 Abstinencia al alcohol	25
	2.4 Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia	25
	2.5 Síndrome de abstinencia al GABA (SAG)	27
3.-	El proceso de Despolarización inducida por Supresión de la Inhibición (DSI) o de la Excitación (DSE)	29
4.-	Bzs y Farmacología del Dz	
	4.1 Abstinencia a Bzs	31
	4.2 Farmacología del Dz	33
	4.3 Farmacodinamia y farmacocinética del Dz	34
	4.4 El Síndrome de Abstinencia a Dz	35
	4.5 Modificaciones EEG y moleculares en la Abstinencia a Dz	35
III	Justificación	37
IV	Objetivo	38
V	Hipótesis	39
VI	Material y Métodos	40
	VI.1 Experimentos <i>in vivo</i>	
	VI. 1.1 Cirugía Estereotáxica	42
	VI. 1.2 Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC)	43
	VI. 1.3 Inducción de crisis convulsivas	44
	VI.2 Experimentos <i>in vitro</i>	46

VII	Resultados	50
	VII. 1 Efectos de la abstinencia al Dz en la excitabilidad cortical	50
	VII. 2 Estudio conductual de la abstinencia a Dz: manifestación de ansiedad durante el síndrome de abstinencia	51
	VII. 3 Hiperexcitabilidad neuronal del área CA1 del hipocampo en rebanadas de cerebro de animales que manifestaron abstinencia al Dz: estudio ex-vivo.	53
	VII. 4 Modificaciones en el protocolo de pulsos pareados en condiciones de hiperexcitabilidad inducidas por Dz.	56
	VII. 5 Modificaciones de la relación de intensidad (estimulación)/ voltaje (amplitud de la respuesta) en condiciones de hiperexcitabilidad inducidas por Dz.	58
	VII. 6 Estudio electro-farmacológico de la neurotransmisión GABAérgica en el cerebro de animales que manifestaron abstinencia a Dz: estudio ex-vivo.	60
	VII. 7 Modificación de la susceptibilidad de inducción de crisis epilépticas por PTZ en animales con abstinencia a Dz.	61
VIII	Discusión	64
	VIII. 1 El síndrome de abstinencia al Diazepam (SAD): descripción.	64
	VIII. 2 Modificaciones electrofisiológicas en el SAD	65
	VIII. 3 Modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica en el SAD: el estudio in vitro tiene implicaciones in vivo.	66
	VIII. 4 Dos perfiles: el ansiogénicos y el epileptogénico en el SAD	69
IX	Conclusiones	73
X	Bibliografía	74

Lista de abreviaturas

aloP	alopregnanolona, tetrahidroprogesterona, 3 α -OH dihidroprogesterona.
AMPA	ácido metil-3-hidroxi 5-metil 4-oxazole propiónico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	ácido ribonucléico mensajero
BA	brazos abiertos
BC	brazos cerrados
Bic	bicuculina
Bz (s)	benzodiazepina (s)
CA1	área CA1 del hipocampo
Ca ²⁺	ión calcio
CB1	receptores para cannabinoides tipo 1
Cl ⁻	ión cloro
Dz	diazepam
DSI	despolarización inducida por supresión de la inhibición (por sus siglas en inglés)
EEG	electroencefalograma, electroencefalográfico
EP (ó SP)	espiga poblacional (por sus siglas en inglés)
fEPSP	potencial postsináptico excitatorio de campo (por sus siglas en inglés)
GABA	ácido (γ) gamma amino butírico (4-aminobutirato)
GABA _A	receptor ionotrópico de GABA (receptor tipo A)
GABA _B	receptor metabotrópico de GABA (receptor tipo B)
GABA-T	enzima GABA-transaminasa
GAD	enzima glutamato descaboxilasa o L-glutamato 1-carboxilasa-liasa.
GHB	ácido γ -hidroxi-butírico
GLU	glutamato o ácido glutámico
GLN	glutamina
h	hora (s)
IIE	intervalo inter-estímulo
IPSP	potencial post-sináptico inhibitorio
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”
K ⁺	ión potasio
K _e ⁺	potasio extracelular
LEC	laberinto elevado en cruz
min	minuto
Na ⁺	ión sodio
NMDA	N-metil D-aspartato
PDS	despolarizaciones paroxísticas de gran amplitud
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PLP	fosfato de piridoxal
PTZ	pentilenetetrazol
SAG	Síndrome de Abstinencia a GABA
SAD	Síndrome de Abstinencia a diazepam
SNC	Sistema Nervioso Central
TACA	ácido trans-4 aminocrotónico
TM	dominio transmembranal
2-AG	2- araquidonil glicerol
DSM-IV	Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales

II Introducción

Actualmente, la búsqueda de placer, el alivio de la tensión, el estrés, así como escapar de la realidad o de la presión social, entre otros factores, ha provocado el uso no médico de distintas drogas. Los patrones de abuso de drogas pueden aplicarse a fármacos "legales" (aprobados por las autoridades médicas y gubernamentales), a drogas ilícitas, así como a drogas "suaves", como el café, el tabaco, el alcohol, el chocolate, el té e incluso la aspirina, o a drogas menos comunes, consideradas "duras", como los opiáceos, la cocaína, las anfetaminas, los sedantes e hipnóticos (benzodiazepinas, barbitúricos), los alucinógenos y los solventes e inhalantes. Las drogas de mayor consumo a nivel mundial siguen proviniendo de plantas tipo cannabis (96 %), opiáceos (87%) y derivados de la hoja de coca (81%). En América prevalece el abuso de cocaína (Medina-Mora et al., 1999).

México ha dejado de ser un país de tránsito de drogas para convertirse en un país consumidor, (Medina-Mora et al., 1999) por cada mujer que ha consumido alguna droga 8 varones lo han hecho y además la edad en la que se comienza a ingerir alguna droga se encuentra entre los 10 y 18 años (Centro de investigación juvenil, 2007), lo que equivale aproximadamente a 2 y medio millones de personas. Un problema emergente es el progresivo insumo de drogas médicas que previamente no habían sido utilizadas con fines de intoxicación, como lo es el flunitrazepam (Rohypnol), el uso de este fármaco es cercano al 1% de la población, de ellos el 42% es menor de edad, con igual índice de consumo en varones y mujeres, mientras que en los adultos se presenta mayoritariamente en los hombres.

El consumo de drogas en México muestra variaciones importantes en las diferentes regiones del país con proporciones más altas en las ciudades ubicadas en la región noroccidental y fronteriza, el insumo de la heroína es un ejemplo del aumento, en 1994 era del 13% sin embargo para el año de 1999 ascendió al 44%, y con índices más bajos en la región sur (Encuesta Nacional de Adicciones, 1998).

El abuso de drogas es un problema social y de salud pública grave que no distingue países, grados de desarrollo económico, clases sociales o religiones. El alcoholismo, en particular, es responsable no sólo de la muerte de cientos de miles de personas cada año,

sino también de la miseria a la que condena a la familia del alcohólico, pasando por la desnutrición y las malformaciones congénitas de su descendencia.

Sin embargo, el consumo de drogas y la generación de la dependencia no conllevan forzosamente que el individuo tenga problemas psicológicos y sea razón para que se vuelva adicto. Se han identificado factores genéticos que hacen a ciertas personas más susceptibles a desarrollar dependencias específicas a ciertas drogas y no a otras, incluso a drogas consideradas "suaves". Otros factores que intervienen en el desarrollo de la dependencia física son: la dosis utilizada, la frecuencia de administración, la rapidez con la que el fármaco es metabolizado y también las razones por las que el sujeto consume la sustancia. Por ejemplo, en pacientes con dolor crónico, el uso prolongado de opiáceos no se acompaña de búsqueda compulsiva del fármaco, característica del síndrome de dependencia física que provoca el consumo de cocaína. Otro factor es la capacidad del individuo para resistir los síntomas de la abstinencia.

En el presente contamos con una diversidad de más de cien drogas psicotrópicas, cuyo manejo adecuado es responsabilidad compartida del médico y del paciente, de las autoridades sanitarias en cuanto a la fármaco-vigilancia, es decir, reportar cualquier efecto tóxico que ponga en riesgo la salud. Es preciso hacer un paréntesis para señalar que el alto costo de los medicamentos impide el acceso a un gran sector de la población.

Es imperativo tanto prevenir el abuso y mal uso de sustancias legales, como combatir de manera drástica la epidemia de las adicciones a drogas como las anfetaminas, la cocaína, la marihuana, la morfina, la heroína y de drogas de abuso médico como las benzodiazepinas. Esta Tesis se enfoca a esta última, como propuesta de un mejor conocimiento de los mecanismos de su abstinencia

La administración crónica de drogas que incrementan la actividad GABAérgica, como las benzodiazepinas (Bzs), los barbitúricos o el alcohol, generan estados de tolerancia y dependencia. El retiro abrupto de la administración de estas drogas favorece a largo plazo la aparición de estados neurológicos caracterizados por cambios en la actividad sensorial-perceptiva, alucinaciones y en casos extremos, crisis convulsivas.

Estudios previos indican que la privación súbita de Diazepam (Dz) después de un tratamiento crónico genera cambios a nivel EEG caracterizados por disminución de las ondas de baja frecuencia durante el sueño, a nivel conductual genera ansiedad y a nivel

molecular hay una sobre expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A asociada a una reducción de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, además de una *up-regulation* del receptor AMPA y *down-regulation* del receptor NMDA.

Con el fin de distinguir los cambios en la actividad neuronal desarrollados por el retiro de Dz, esta tesis estudió las modificaciones de la excitabilidad *in vivo* e *in vitro* sobre el sistema GABAérgico.

En la introducción de esta tesis se enmarcan los aspectos básicos de la neurotransmisión dependiente del GABA, sus receptores, su fisiología y su importancia en el cerebro, específicamente en el hipocampo. Posteriormente, se hace énfasis en los mecanismos en común de los síndromes de abstinencia y lo referente a la abstinencia al GABA *in vitro*, describiéndolo como el bioensayo farmacológico y electrofisiológico para el estudio de las abstinencias GABAérgicas. La justificación de la presente tesis que enmarca a los objetivos generales, se relaciona con la farmacología de las Bzs y su actividad en la neurotransmisión GABAérgica. En material y métodos se describen las técnicas utilizadas y los análisis que fueron necesarios para la obtención de los resultados. La última parte de este volumen contiene la discusión de los resultados y las conclusiones que confirman que un tratamiento crónico de Dz induce un incremento en la actividad neuronal: la aparición de complejos espiga-onda en el EEG, relacionados con el incremento en los niveles de ansiedad, se corroboró con el aumento en la susceptibilidad a desarrollar crisis convulsiva por aplicación de PTZ e incremento significativo de la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo.

1.- Sistema inhibitor GABAérgico

1.1 El GABA, síntesis y metabolismo

Un neurotransmisor es una molécula derivada principalmente de un aminoácido o de su metabolismo intermediario, es sintetizado por reacciones enzimáticas, almacenado en vesículas de las terminales sinápticas y liberado por la despolarización membranal (Deutch y Roth, 1999). Ejerce un efecto inhibitor cuando es capaz de deprimir la excitabilidad neuronal. Durante la inhibición se disminuye la probabilidad de que una neurona genere potenciales de acción. En el hipocampo y en la corteza cerebral la inhibición se produce por circuitos neuronales locales establecidos por interneuronas, de las cuales, más del 90% son GABAérgicas (Nurse y Lacaille, 1997). Estas células inhiben a las neuronas de proyección (piramidales), lo cual establece una de las más importantes regulaciones de la excitabilidad del sistema nervioso central (SNC; Luddens et al., 1995).

El GABA fue descubierto en 1950 por Eugene Roberts (Krnjevic', 1991) y fue hasta 1957 cuando se publicó la primera evidencia que sugería que el GABA era un neurotransmisor. Bazemore y colaboradores (1956) identificaron una sustancia endógena o "factor I" como responsable de la acción inhibitora de los extractos de tejido nervioso sobre neuronas de langostino (Krnjevic', 1997). Un año después se mostró que el GABA aplicado en forma directa a la corteza cerebral tenía efectos sobre la actividad eléctrica y se dieron evidencias de que involucraba el movimiento iónico en las neuronas (Krnjevic', 1984; Houser et al., 1984). En 1966 se obtuvieron pruebas convincentes del carácter inhibitorio del GABA, al estudiar la placa neuromuscular del crustáceo (Kuffler et al., 1984).

Este neurotransmisor es un pequeño aminoácido monocarboxílico (100 daltones), su nombre proviene de las siglas en inglés de su estructura molecular: ácido γ -aminobutírico (4-aminobutirato, de acuerdo a su característica de aminoácido) y representa al principal neurotransmisor inhibitor del cerebro en los mamíferos (Olsen y Tobin, 1990; McKernan y Whithing, 1996; Avoli et al., 1997).

El GABA se produce en las terminales nerviosas por descarboxilación del glutamato, por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) también conocida como L-glutamato-1-carboxilasa-liasa. La mayor parte del ácido glutámico necesario para la formación del GABA no proviene del torrente sanguíneo, la neurona

posee un mecanismo enzimático de síntesis a partir de una transaminación oxidativa debida a la α -cetoglutarato transaminasa (GABA-T), o por un proceso de desaminación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa; por lo que de acuerdo a estos eventos metabólicos las fuentes del ácido glutámico son: 1) la transformación del α -cetoglutarato, metabolito del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ó 2) la desaminación de la glutamina (fig. 1; DeLorcy y Olsen, 1994; Deutch y Roth, 1999).

Un aspecto interesante en la síntesis del GABA es el que la enzima que produce al sustrato (glutamato) también lo degrada. El GABA es transformado a semialdehído succínico por la GABA-T en presencia de α -cetoglutarato como co-sustrato para la reacción. Así, la GABA-T es la clave de la síntesis y del catabolismo del GABA. Estos aspectos hacen diferente la síntesis del GABA a la de otros neurotransmisores, ya que el GABA es un derivado directo del metabolismo intermediario de la glucosa y del glutamato (Fig. 1; Paul, 1995).

Figura 1

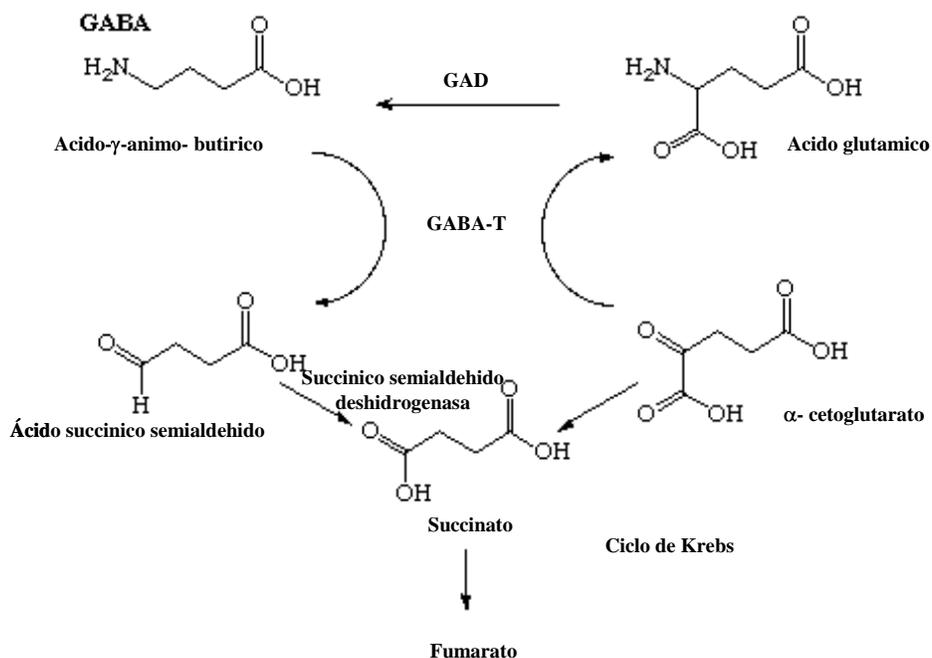


Diagrama de la síntesis del GABA. El GABA es sintetizado por la descarboxilación del ácido glutámico mediante la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). La GABA-T es la enzima que se encarga de degradar al GABA y es la encargada de proveer el sustrato para su síntesis (tomada de Paul, 1995).

La GAD es una enzima citosólica mientras que el glutamato es sintetizado en la mitocondria, por lo que es necesario un transporte o derivación del precursor de un compartimiento a otro para garantizar la producción de GABA. La GAD es crítica para el control de la excitabilidad neuronal, ya que la disminución de su actividad favorece la aparición de convulsiones (Tapia et al., 1975) y es blanco en el tratamiento de algunas epilepsias (Foster y Kemp, 2006; Wu et al., 2007). Esta enzima tiene como cofactor a un derivado de la vitamina B6, el fosfato de piridoxal (PLP; por sus siglas en inglés). La GAD está presente en las neuronas en dos formas, las cuales se encuentran codificadas por dos genes distintos. De acuerdo con su peso molecular las isoformas son distinguidas como GAD65 y GAD67. Estas enzimas exhiben algunas diferencias en su distribución molecular, lo que sugiere que estas dos formas de GAD pueden regular diferentes vías de síntesis de GABA. Estas GADs difieren significativamente en su afinidad por el PLP: la GAD65 muestra una alta afinidad al cofactor en tanto que la GAD67 posee una débil interacción con el PLP. La GAD65 es una enzima cuya actividad es rápida y eficientemente regulada. La GAD67 se regula a nivel transcripcional y su expresión depende de la excitabilidad de la neurona (Tapia y Sandoval, 1971; Covarrubias y Tapia, 1980). La GAD no esta presente en neuronas en las que el ácido glutámico es utilizado como neurotransmisor, es decir, las neuronas glutamatérgicas no utilizan al GABA como neurotransmisor (Paul, 1995).

1.2 Recaptura del GABA

Estudios farmacológicos han mostrado que el GABA después de ser liberado por la terminal nerviosa es capturado nuevamente por las neuronas y por la glía. La recaptura depende del gradiente electroquímico del Na^+ , por lo que es dependiente de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ . Además, la glía tiene capacidad de almacenar GABA. La recaptura de GABA es el mecanismo primario de la inactivación de su efecto. El transportador es una proteína de doce pasos transmembrana, tiene sitios de glicosilación, y varios 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). Actualmente, se distinguen tres distintos transportadores de GABA. Uno de ellos es expresado en forma

específica por neuronas (SA1/2), otro lo expresan únicamente las células gliales (SN1) y el tercero es común para ambos tipos de célula (Fig. 2; Guastella et al., 1990; Liu et al., 1992).

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

1.3 Fisiología del sistema GABAérgico

El GABA tiene efectos en ambas membranas de la sinapsis (Krnjevic', 1997). El efecto a nivel presináptico es una disminución del ingreso de calcio (Ca^{2+}) al botón terminal, debido a una activación del receptor GABA_B –el cual se describe a detalle en el punto 1.4 de esta tesis-. Debido a que el Ca^{2+} es un catión involucrado en la maquinaria de liberación de neurotransmisores en la terminal nerviosa, el GABA en el componente presináptico genera una disminución en la liberación de diversos neurotransmisores.

A nivel post-sináptico, el mecanismo principal se debe a un rápido incremento en la conductancia al cloro (Cl^-), lo cual tiene un efecto hiperpolarizante de la membrana neuronal. Además, en algunas neuronas se incrementa una conductancia lenta de potasio (K^+) fortaleciendo la hiperpolarización. A todo el evento postsináptico se le denomina potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP por sus siglas en inglés; Borman, 1988; Krnjevic', 1991, 1997). Recientemente se ha demostrado que durante la activación prolongada de los receptores de GABA en la dendrita, la respuesta de la membrana post-sináptica cambia de hiperpolarización a despolarización (Staley y Proctor, 1999). Una explicación para el cambio del efecto inhibitorio del GABA es la siguiente: el incremento del flujo de Cl^- y HCO_3^- a través del receptor ionotrópico tipo A para GABA (GABA_A) incrementa la concentración de estos aniones en el interior de la célula, por lo que disminuye su fuerza electroquímica y en consecuencia su flujo al interior de la neurona

también disminuye. Además, al cambiar su potencial de equilibrio, se favorece un egreso del HCO_3^- , produciendo un evento despolarizante (Grover et al., 1993). Esta despolarización disminuye el bloqueo dependiente de voltaje del receptor NMDA (N-metil D-Aspartato) por parte del ión magnesio, por lo que esta actividad mediada por GABA es suficiente para la activación sináptica del receptor NMDA (Staley et al., 1995). De tal forma, que las respuestas post-sinápticas GABAérgicas en neuronas corticales pueden consistir en una temprana “hiperpolarización somática” (también denominada respuesta h-GABA_A) y una respuesta “despolarizante dendrítica” (o respuesta d-GABA_A; Bonnet y Bingmann, 1995). En conclusión, los flujos de HCO_3^- contribuyen a la respuesta d-GABA_A, en tanto que la respuesta h-GABA_A es principalmente debida a Cl^- (Perkins y Wong, 1997).

Los efectos del GABA a nivel pre y post-sináptico son consecuencia de su interacción en la membrana a través de proteínas receptoras. Los receptores para el GABA están divididos en dos grandes grupos, uno asociado a proteínas G y nucleótidos cíclicos, denominado tipo B o GABA_B o de tipo metabotrópico. El otro es el ya mencionado GABA_A o de tipo ionotrópico. Un subgrupo de receptores GABA_A ha sido denominado GABA_C y se encuentra exclusivamente en retina.

Figura 2

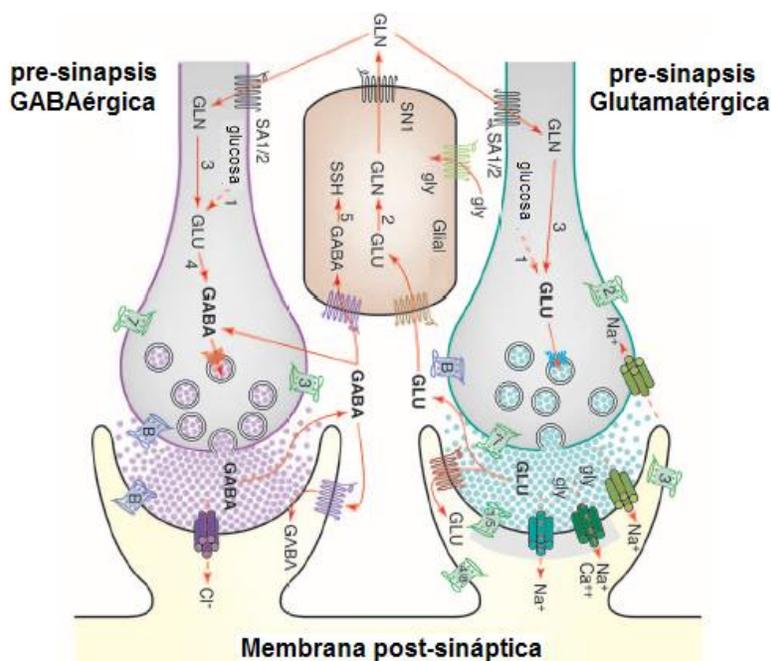


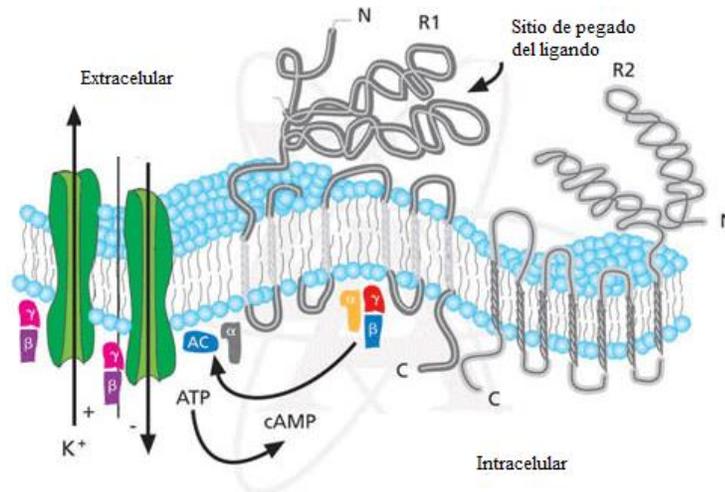
Diagrama bioquímico y fisiológico de las 2 neurotransmisiones más importantes en el SNC. A la izquierda, la dependiente del GABA. La glutamina (GLN) es capturada por la glía (al centro) por medio de su transportador específico (SN1) o en la terminal pre-sináptica por el SA1/2. La GLN es desaminada por la enzima glutaminasa para convertirse en glutamato (GLU, paso 3). El GLU también puede ser un metabolito intermedio de la oxidación de la glucosa (transaminación del α -cetoglutarato, paso 1). El GLU se transforma en GABA por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, paso 4). El GABA puede interactuar con sus receptores pre y post-sinápticos y/o ser capturado por un transportador glial (GAT1-4) o neuronal. El GABA es catabolizado por la enzima succinato deshidrogenasa en succinato semialdehído (SSH; paso 5). El efecto de ésta neurotransmisión es inducir una disminución de la actividad neuronal. En contraste, a la derecha se distingue la neurotransmisión excitadora dependiente de GLU. Sus efectos se explican debido a que este neurotransmisor incrementa la conductancia de Na⁺ y Ca²⁺ generando una despolarización postsináptica (Modificado de Foster y Kemp, 2006).

1.4 El receptor GABA_B

El receptor GABA_B es una proteína de aproximadamente 80 kDa (Ohmori y Kuriyama, 1991) con siete pasos transmembrana. Es miembro de la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (específicamente Gi y Go; Soltesz et al., 1988; Kaupmann et al., 1997). Su agonista selectivo es baclofén y el ácido 3-amino propil fosfonato; en tanto que los antagonistas selectivos de este receptor son el saclofén y el faclofén (Kerr et al., 1987; Karlsson et al., 1988). El receptor GABA_B se encuentra en ambas membranas sinápticas: a nivel presináptico es el receptor que permite la disminución en la liberación de neurotransmisores por un bloqueo en el ingreso del Ca²⁺ a la terminal sináptica vía proteínas G, de tal forma que al ser activado inhibe la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Thompson y Gahwiler, 1992). En la región post-sináptica la

activación de éste receptor induce el incremento en la conductancia a K^+ (Fig. 3), lo que se identifica como la porción lenta del potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP, por sus siglas en inglés; Deutch y Roth, 1999). El receptor $GABA_B$ no está involucrado en la cascada de segundos mensajeros dependientes de proteína Gq- IP_3/Ca^{2+} (Komatsu, 1996; Tareilu, et al., 1994).

Figura 3



Esquema del receptor $GABA_B$. Receptor metabotrópico formado de dos heterodímeros cada uno de siete pasos transmembranales, acoplado a proteínas G. R1, R2 representan el sitio de pegado del ligando (GABA), al activarse el receptor pre-sináptico bloquea los canales voltaje dependientes de Ca^{2+} y post-sináptico favorece las conductancias de K^+ (Modificado de Purves D. et al., 2006)

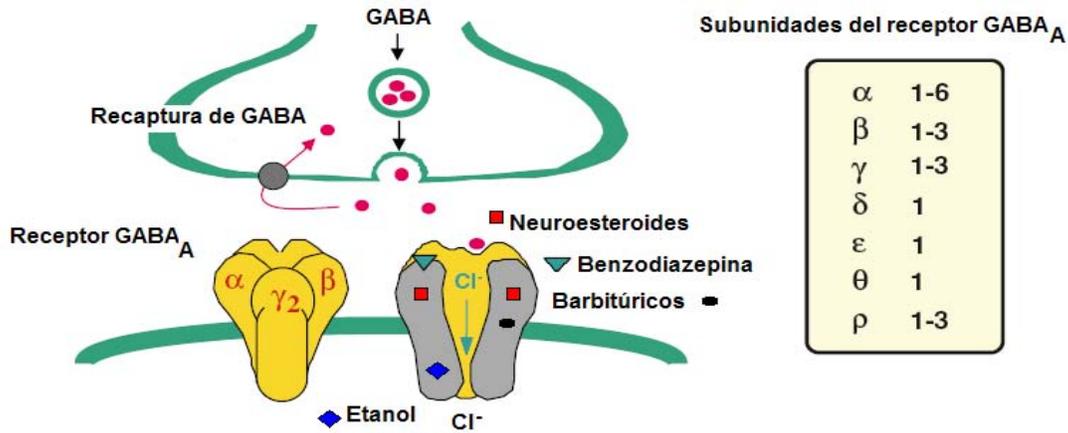
1.5 El receptor $GABA_A$

El receptor $GABA_A$, tiene una composición semejante a los receptores ionotrópicos de la acetilcolina (nicotínico), de la glicina y la serotonina ($5-HT_3$). Estas proteínas están formadas por subunidades (Fig. 4), por lo que las familias de estos receptores presumiblemente derivan de genes similares. El receptor $GABA_A$ es un complejo molecular integrado como heteropentámero de peso aproximado entre 275 a 400 kDa (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart et al., 1999).

El estudio de la estructura molecular del receptor $GABA_A$ ha permitido caracterizar a las subunidades que lo forman. Estas proteínas se denominan con las letras griegas: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) épsilon (ϵ), rho (ρ) y theta (θ); además, es posible distinguir diversos tipos: 6 diferentes subtipos de α ; 3 distintas β , 3 tipos de γ , 1 forma de δ , 1 de tipo ϵ , 3 formas de ρ y un solo tipo de θ (Fig. 4; Kardos, 1999; Chebib y Johnston,

1999). Cada subunidad tiene su dominio N-terminal del lado extracelular, el cual puede ser el sitio de ligando de varias moléculas.

Figura 4



Representación del receptor GABA_A. Este receptor ionotrópico es un complejo proteico alostérico reconocido por diferentes ligandos y en sitios distintos. Al ser activado permite el ingreso de Cl⁻ a la célula, lo cual favorece un efecto hiperpolarizante. Su estructura es heteropentamérica, compuesta por 7 clases diferentes de subunidades, algunas cuentan con variables funcionales (Modificado de Mohler, 2006).

Todas las subunidades presentan 4 dominios transmembranales denominados TM1, TM2, TM3, y TM4; la región TM2 representa un especial interés: su estructura de α-hélice permite la formación de un canal iónico. La interacción de esta región con otras 3 ó 4 TM2 proporciona el revestimiento del canal. Localizado en la región del citosol cada TM tienen 2 anillos de residuos de aminoácidos, el anillo que conecta a las regiones TM3 con TM4 contienen residuos de serina, un excelente blanco susceptible de ser fosforilado. La secuencia de aminoácidos que componen a cada una de las subunidades del receptor GABA_A tiene una masa molecular en el rango de 48 a 64 kDa y además, muestra entre un 30 a 40% de identidad entre los distintos grupos de subunidades y un 70 a 80% de identidad entre subunidades del mismo grupo (Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996; Hevers y Luddens, 1998).

Basándose en esta heterogeneidad de isoformas, el ensamble variable de las subunidades otorga diversidad en las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor. A partir de esta variedad de subunidades se puede calcular una combinación de más de 10 000

isoformas posibles del receptor GABA_A, aunque no todas son funcionales (Wafford et al., 1994; Araki et al., 1992; Wang et al., 1992; Zhang et al., 1992; Bovolin et al., 1992; Araki et al., 1992a y b).

El sitio de pegado del GABA a su receptor es a nivel de las subunidades α y β . Específicamente, en la subunidad $\alpha 1$ el residuo del aminoácido fenilalanina en la posición 64, es determinante para el pegado del neurotransmisor; mientras en la subunidad β los residuos de tirosina 157 y 205 así como las treoninas 160 y 302 son indispensables para el pegado del GABA. Cuando el neurotransmisor se une a su receptor ionotrópico los aniones pasan al interior de la neurona produciendo hiperpolarización o un cambio en el potencial de membrana, que lo aleja del umbral de disparo del potencial de acción. Este fenómeno se debe a un cambio conformacional de la proteína receptora que la convierte en un canal, el cual es significativamente largo (5-8 Å). La formación de un canal selectivo en estas condiciones permite el flujo de Cl⁻ y aniones al interior de la célula. Esta selectividad proviene de la carga positiva de los aminoácidos que estratégicamente se encuentran en la porción final del canal.

El receptor-canal exhibe 3 diferentes conductancias las cuales se encuentran entre los 12, 17-20 y 27-30 pS; además se han revelado tres diferentes estados de apertura: 0.5, 2.6 y 7.6 mili segundos (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; McKernan y Whiting, 1996).

1.6 Modulación del GABA_A

El receptor GABA_A es una proteína alostérica. Esto significa que sus propiedades de receptor pueden ser moduladas por la unión de otros compuestos que no se unen al mismo sitio que reconoce al GABA. Ciertos fármacos hacen más eficiente la transmisión GABAérgica, incrementando la frecuencia de apertura del receptor/canal o cambiando el tiempo de apertura del canal. Ejemplos de estos moduladores son los neuroesteroides, el alcohol, los barbitúricos y las Bzs, ya que estas moléculas se unen al receptor y potencian la actividad del GABA, por ejemplo, desplazan la función concentración-respuesta de GABA hacia a la izquierda (Hadingham et al., 1992; McKernan y Whiting, 1996). Específicamente, las Bzs son moduladoras de las corrientes de Cl⁻ ya que incrementan la frecuencia de apertura del canal pero no la duración de los estados abiertos, en tanto que los

barbitúricos alteran las características de las corrientes GABAérgicas incrementando la duración de las aperturas del canal. De tal forma que el resultado neto de la presencia de barbitúricos o Bzs o ambos es el incremento de la inhibición neuronal (Macdonald y Olsen, 1994; Kardos, 1999). Las Bzs tienen su sitio de unión en el receptor al nivel de las subunidades α y β . Sin embargo, quien confiere la afinidad por las mismas es la subunidad γ , principalmente el subtipo 2 (γ_2). El efecto alostérico de las Bzs es uno de los más estudiados. Una particularidad farmacológica más, es que para que el efecto de las Bzs se lleve a cabo, el GABA debe estar presente (Bureau y Olsen, 1990; Knapp et al., 1990).

El sitio de interacción de los barbitúricos se localiza en las subunidades α y β del receptor. Los barbitúricos tienen un modelo dual de acción: a concentraciones pequeñas su efecto depende de la presencia del GABA, sin embargo, a grandes concentraciones el efecto de incremento en el tiempo de la apertura del canal depende exclusivamente del barbitúrico.

La bicuculina (Bic), un potente convulsivante, disminuye la unión del GABA al receptor de manera competitiva. Los antagonistas del receptor GABA_A mejor estudiados son el t-butilbiclofosforotionato (TBPS), y la penicilina, que bloquea el poro (Ruano et al., 1991; Costa, 1987; Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999). En tanto que agonistas selectivos de este receptor son la isoguvacina y el muscimol.

1.7 Distribución del GABA_A en el SNC

Es conveniente hacer varias apreciaciones respecto al receptor GABA_A, su distribución en el cerebro y los efectos farmacológicos diferenciales que pueden obtenerse a partir de su interacción con sus ligandos. En esta dirección es posible identificar que una misma neurona es capaz de expresar diferentes tipos de receptor GABA_A y por lo tanto tener susceptibilidad farmacológica variable (García-Ugalde y Brailowsky, 1993).

Estudios farmacológicos previos dan evidencias de una segregación espacial de los receptores GABA_A y GABA_B postsinápticos en células piramidales. La respuesta postsináptica del receptor GABA_B es generada primariamente en dendritas, en tanto que la respuesta GABA_A se produce en el soma y las dendritas.

Exceptuando a las subunidades ρ que se expresan únicamente en la retina y las π que se encuentran en timo, pulmón, próstata y útero, las otras subunidades se expresan

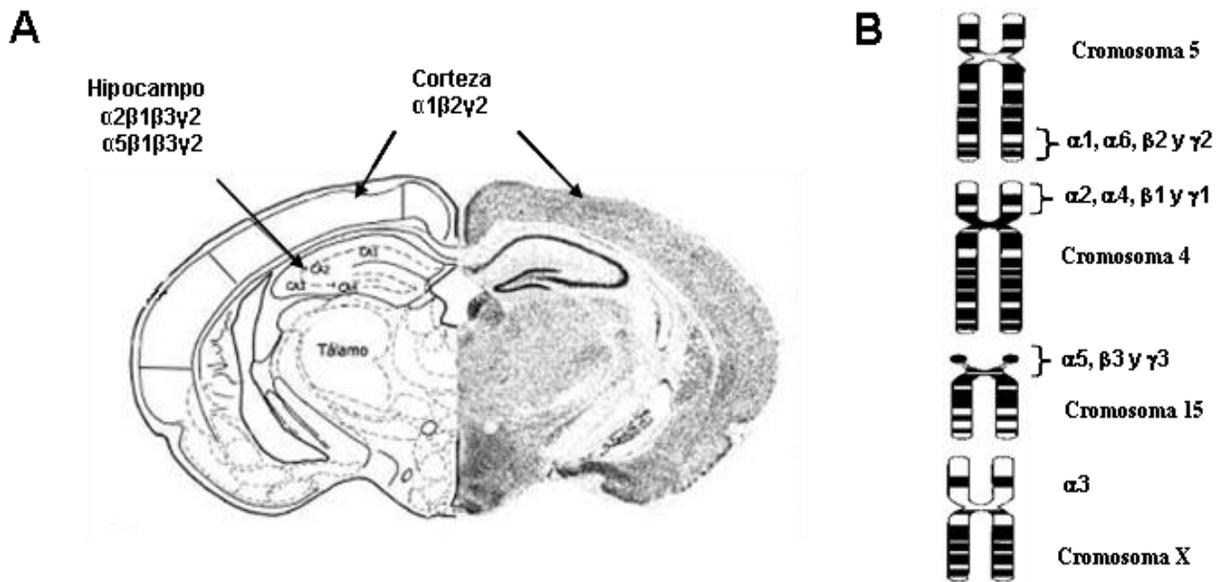
ampliamente en el cerebro. El receptor GABA_A de la retina es farmacológicamente insensible a Bic aunque es sensible a picrotoxina. Adicionalmente, este receptor no muestra modulación por barbitúricos, Bzs y baclofén por lo que se le denominó GABA_C (Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999). Los receptores GABA_C son derivados de la unión de varias isoformas de la subunidad ρ , capaces de formar el canal de Cl⁻ (Fig. 5). Los agonistas descritos para este subtipo de receptor son el ácido cis-4-amino crotónico o ACCA y el ácido trans-4-amino crotónico (TACA). En cuanto a los antagonistas del receptor GABA_C, el mejor estudiado es el ácido imidazol-4-acético y el ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina -4il-metil-fosfónico.

Estudios de biología molecular han permitido el mapeo de algunas subunidades del receptor GABA_A en el genoma humano. Por ejemplo, los genes que codifican a las subunidades α 1, α 6, β 2 y γ 2 se encuentran en el cromosoma 5 en las regiones q32-q33. En tanto que las subunidades α 2, α 4, β 1 y γ 1 se encuentran en el cromosoma 4 en las porciones p13-4q11, en el caso de la subunidad α 5, β 3 y γ 3 se encuentran en el cromosoma 15 en sus regiones q11-q13. La subunidad α 3 se encuentra codificada en un gen que reside en el cromosoma X (Fig. 5; Thompson et al., 1992; Wilcox et al., 1992).

No obstante que los ARNm (ácidos ribonucleicos mensajeros) que traducen para las subunidades del receptor GABA_A se encuentran en casi todo el cerebro, pueden distinguirse distribuciones heterogéneas en algunas regiones del SNC. Por ejemplo, las células granulares del cerebelo expresan casi exclusivamente la subunidad α 6, en tanto que la subunidad α 1 se expresa principalmente en neocorteza y cerebelo, dejando únicamente el 5% de todos los receptores GABA_A para la expresión de la α 5 en hipocampo, corteza cerebral, amígdala y el bulbo olfatorio. En corteza cerebral son muy comunes las subunidades α 1-4, al igual que la isoforma β 2, en tanto que las subunidades β 1 y 3 son más comunes en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el cerebelo. Por otra parte, las subunidades β 4 y γ 4 se han descrito solamente en el cerebro del pollo. Es interesante que la subunidad γ 1 se expresa predominantemente en la amígdala del lóbulo temporal y el septum, la variante γ 2 se encuentra prácticamente en todo el cerebro, y es muy común localizarla en presencia de β 2 y α 1 (Essrich et al., 1998), la subunidad γ 3 esta presente en la corteza y el estriado. La triple combinación α 1 β 2 γ 2 conforma la población más frecuente

del receptor GABA_A en corteza cerebral, en comparación con el hipocampo en donde es común la expresión de las subunidades $\alpha 2\beta 1\beta 3\gamma 2$ y $\alpha 5\beta 1\beta 3\gamma 2$ (McKernan y Whiting, 1996). La subunidad $\gamma 2$ tiene dos isoformas: larga ($\gamma 2L$) y corta ($\gamma 2S$; por sus siglas en inglés), la subunidad $\gamma 2S$ es más abundante que la $\gamma 2L$ en el hipocampo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio, en contraste en el colículo inferior, el bulbo y en el cerebelo se expresa más $\gamma 2L$ que $\gamma 2S$. La subunidad δ esta predominantemente en el cerebelo. En tanto que la subunidad ϵ esta presente en amígdala, tálamo y núcleos subtalámicos (Hevers y Luddens, 1998; Mehta y Ticku, 1999; Moler, 2006).

Figura 5



Distribución y expresión de receptores GABA_A A) Principales receptores GABA_A en la corteza cerebral y el hipocampo. B) Expresión de algunas subunidades del receptor GABA_A en el genoma humano (Modificado de Hevers y Luddens, 1998; Mehta y Ticku, 1999, Moler, 2006).

La coexpresión de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ asociadas con $\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$ con $\gamma 2$ integran a los receptores GABA_A en los que se cuantifica una mayor actividad de las Bzs.

Se puede realizar una subdivisión farmacológica del receptor GABA_A en relación con el efecto y el pegado de las Bzs. El receptor tipo I (BZI), une con mayor afinidad a la trizolopiridazina (Cl 218 872) en tanto que el receptor tipo II (BZII) une con gran afinidad al 1,4 Bz: 2 oxo-quazepam. El receptor BZI abunda en cerebelo, en tanto que el BZII se encuentra en casi todo el cerebro. Para otro tipo de fármacos, como el TBPS, el pegado al

receptor estructurado con $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ es muy grande, en tanto que para algunos esteroides se ha identificado que la presencia de $\beta 2\gamma 2$ con cualquier isoforma de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ es importante para una modulación positiva más potente (Fritschy et al., 1992; Puia et al., 1993).

Diversos estudios indican que la fosforilación del receptor GABA_A modifica las corrientes de Cl⁻ inducidas por GABA, Bzs y alcohol. La fosforilación puede incrementar (Stelzer et al., 1988; Browing et al., 1990) o disminuir estas corrientes (Leidenheimer et al., 1992; Leidenheimer y Chapell, 1997), modificando la cinética de activación y el proceso de desensibilización del receptor. Esta modulación por fosforilación depende de distintas enzimas derivadas de diversos segundos mensajeros como la PKA, la PKC y por la proteína Ca²⁺ calmodulina-cinasa. El blanco de estas fosforilaciones son los residuos de serina de las asas que comunican a M3 y M4 de las subunidades β . De esta forma, la actividad de este receptor ionotrópico puede ser modulada por señales externas e internas (Lambert y Harrison, 1990; Krishek et al., 1994; Bureau y Laschet, 1995; Zhai et al., 1998; Churn y DeLorenzo, 1998).

Los cambios en la neurotransmisión GABAérgica tienen un papel preponderante en la fisiopatogénesis de diversos trastornos neuronales como la epilepsia, los síndromes de abstinencia, entre otros, estos trastornos tienen como característica principal el incremento de la excitabilidad neuronal, esta hiperexcitabilidad es consecuencia de alguno de los siguientes eventos que pueden surgir solos o asociados entre ellos: a) modificaciones en la síntesis del GABA, b) disminución en la liberación del GABA, c) cambios en la recaptura del GABA, d) modificaciones en la estructura del receptor, e) cambios en el número de receptores, y finalmente, f) cambios en la afinidad del receptor GABA_A. Estos eventos son los puntos de estudio de nuestro grupo de trabajo y sobre los cuales se basa parcialmente la hipótesis de esta tesis.

2.- Síndromes de Abstinencia asociados con la neurotransmisión GABAérgica

A lo largo de la historia humana, las sociedades han consumido sustancias que alteran el estado de ánimo y el funcionamiento cognoscitivo, por ejemplo: el alcohol, la nicotina y la marihuana, entre muchas otras drogas. Además, en algunos casos, el progreso en el conocimiento farmacológico ha traído consigo nuevas drogas que propician

modificaciones en el funcionamiento del SNC, como es el caso de los psicotrópicos. Diversos agentes neurofarmacológicos utilizados con un fin terapéutico pueden cambiar la conducta del paciente generando estados de tolerancia y dependencia física e intelectual.

2.1 Tolerancia y dependencia

La tolerancia puede ser definida como la reducción en los efectos de una droga después de ser administrada en forma repetida (Fig. 6; Midel, 1981). Normalmente, conforme se aumenta la dosis de un fármaco, aumenta también su efecto observado. Sin embargo, después de dosis repetidas se requiere de dosis cada vez mayores para obtener el efecto logrado en la primera exposición (desviación a la derecha de la curva dosis-efecto). El diazepam (Dz) por ejemplo, produce de una manera característica sedación a dosis de 5 a 10 mg en el consumo por primera vez. Sin embargo, quien lo toma en forma repetida puede hacerse tolerante a grandes dosis (Teuber et al., 1999).

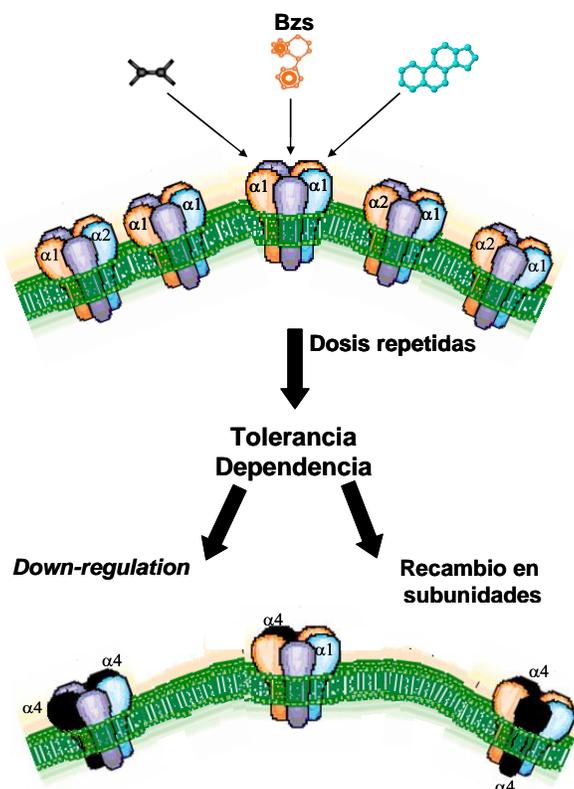
Actualmente se distinguen diferentes tipos de tolerancia que pueden subclasificarse en tres: 1) tolerancia farmacocinética, 2) tolerancia farmacodinámica y 3) tolerancia aprendida. Está última incluye una forma de tolerancia conductual que también se llama tolerancia condicionada (Cox et al., 1983; Feldman et al., 1996).

El término de tolerancia farmacocinética o de eliminación, se refiere a los cambios de distribución o metabolismo del fármaco después de la administración repetida, de modo que hay concentraciones plasmáticas reducidas en la sangre y, de manera subsiguiente, en los sitios de acción de dicho fármaco. El mecanismo más frecuente es el aumento en la tasa metabólica de eliminación. Un ejemplo de este proceso es el de los barbitúricos, ya que estimulan la producción de enzimas microsomales en el hepatocito, con el consecuente retiro y catabolismo rápido de los barbitúricos de la circulación (McLellan et al., 1992).

La tolerancia farmacodinámica, funcional o de tipo celular, se relaciona principalmente con la disminución o incremento en el número de receptores (*down/up regulation*; Fig. 6,) asociado o no a cambios en la afinidad del receptor por la droga (fosforilación-desfosforilación). También puede deberse a un desacoplamiento de las cadenas de señalización con el receptor (fosforilación, desfosforilación, cambios en el genoma, desensibilización; Feldman et al., 1996).

De manera adicional a los tres tipos básicos de tolerancia, la tolerancia aguda se refiere a aquella que se genera rápidamente tras el empleo de un fármaco en una sola ocasión. El ejemplo típico de este tipo de tolerancia es el producido por la administración de cocaína. Si se administra repetidamente, los efectos de dosis subsiguientes disminuyen en cuestión de horas y a lo largo de la misma sesión (Lader y File, 1987).

Figura 6



Representación del mecanismo molecular de la tolerancia y la dependencia. La modulación alostérica del receptor GABA_A es llevada a cabo por diversas sustancias entre ellas las Bzs, sin embargo, el efecto manifestado en la primera aplicación se ve reducido en las aplicaciones subsiguientes (tolerancia), además el sistema se reajusta a la administración repetida de la sustancia (dependencia). Estas aplicaciones producen la disminución del número de receptores en la membrana (*down-regulation*) y un recambio en algunas subunidades del receptor GABA_A, en el caso del Dz se disminuyen las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y se incrementa la expresión de la $\alpha 4$, esto modifica la sensibilidad farmacológica del receptor.

La tolerancia cruzada ocurre cuando el uso repetido de una sustancia confiere tolerancia no sólo a la sustancia que se está empleando, sino también a otras de la misma categoría estructural o mecánica, efecto que se observa entre las Bzs y los barbitúricos (Robinson et al., 1981).

En contraste con la tolerancia, la sensibilización es un incremento en la respuesta originado por la administración de la dosis repetida del fármaco. Este fenómeno se observa como una desviación hacia la izquierda de la curva dosis-respuesta (O'Brien, 1996).

La dependencia es un término clínico que se refiere a un estado de adaptación (tolerancia) producido por el reajuste de los mecanismos homeostáticos ante la administración repetida de una sustancia (Fig. 6). La droga puede afectar múltiples sistemas que antes estaban en equilibrio. La persona en estado de dependencia física o adaptada, requiere de una administración sostenida del fármaco para desempeñar sus actividades normales. Si en forma repentina, esta sustancia deja de administrarse, ocurrirá un desequilibrio brusco, y los sistemas afectados deberán someterse de nuevo a un proceso de reajuste hasta alcanzar un nuevo equilibrio sin la sustancia.

La prueba clínica de la dependencia física es la aparición del "síndrome de abstinencia" o síndrome de supresión cuando la droga ha dejado de administrarse. Las variables farmacocinéticas tienen importancia considerable en la amplitud y en la duración del síndrome de supresión. Cada categoría de sustancias conlleva síntomas característicos, que suelen ser contrarios a los efectos del fármaco (O'Brien, 1996).

Tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia son fenómenos biológicos que resultan como consecuencia natural del consumo y retiro de ciertos fármacos o sustancias. Estos fenómenos biológicos se pueden producir en animales de experimentación. Estos modelos pueden ser un correlato del evento que se registra en el humano. A continuación se mencionan las principales abstinencias que involucran al sistema GABAérgico y el enfoque actual que se les da en el campo de las neurociencias.

2.2 Abstinencia a Barbitúricos

La síntesis del primer barbitúrico se realizó en 1863, en la actualidad más de 2,500 derivados de esta sustancia son utilizados en la medicina. Los barbitúricos se utilizan especialmente para el tratamiento de la ansiedad, el insomnio y como un anestésico. Los efectos de los barbitúricos son similares a los observados con el alcohol. Dosis únicas de 200 a 400 mg de amobarbital producen en pocas horas disminución de la atención, disforia, distorsión en la sensación del tiempo, disminución en la actividad intelectual, nistagmo y diplopía. Altas dosis generan depresión respiratoria e hipoxia (O'Brien, 1996).

La privación de barbitúricos después de dosis repetidas induce cambios electroencefalográficos, tales como un incremento en la actividad basal, predominantemente en la región frontal del cerebro.

2.3 Abstinencia al alcohol

La abstinencia alcohólica se desencadena por un descenso absoluto o relativo de los niveles de alcohol en sangre. Habitualmente aparece un temblor generalizado rápido, más perceptible en la lengua y las manos, que empeora con la actividad motora o situaciones estresantes, los síntomas alcanzan la plenitud a las 48 h del último consumo, el inicio de esta sintomatología puede ser brusco o gradual. Desde el punto de vista clínico, presenta unos pródromos caracterizados por temblor, alucinaciones visuales y ansiedad. El período llamado *delirium tremens*, caracterizado por un descenso del nivel de conciencia, actividad psicomotriz alterada, alucinaciones visuales y agitación psicomotriz. En el plano neurológico se muestra disartria, con temblores de grandes oscilaciones y síntomas de ataxia cerebelosa. Pueden presentarse crisis convulsivas acompañadas de confusión, desorientación, conciencia fluctuante y obnubilación. El cuadro alcanza su cenit a los 2-3 días de su inicio y puede mantenerse durante varios días. El riesgo de muerte es relativo pero en casos tratados la tasa de mortalidad es inferior al 1 % (Brailowsky y García, 1999).

El manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV) plantea los siguientes criterios comunes para el diagnóstico de la abstinencia de sedantes-hipnóticos y ansiolíticos: 1. Interrupción o reducción del uso abundante o moderado durante un período prolongado (varias semanas o más), de un sedante, hipnótico o ansiolítico seguida como mínimo, de tres de los siguientes síntomas: náuseas o vómitos, malestar general y/o debilidad, hiperactividad autónoma (p. ej. taquicardia, diaforesis, ansiedad o irritabilidad), hipotensión ortostática, temblor de manos, lengua y párpados, insomnio y crisis epilépticas. 2. Dichos síntomas no deben estar causados por ningún otro trastorno físico o mental.

Un común denominador de las abstinencias por drogas que involucran a la neurotransmisión GABAérgica es la hiperexcitabilidad del SNC. Pero, ¿cuáles son los posibles mecanismos responsables de la aparición de estos eventos clínicos?

2.4 Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia

Las modificaciones en el receptor GABA_A puede ser el origen de las alteraciones en los fenómenos que caracterizan a la abstinencia a sustancias depresoras del cerebro, así como en algunos trastornos conductuales y en algunos tipos de epilepsia. La expresión del ARNm de las subunidades del receptor cambia debido a la excitabilidad neuronal, ya que después de crisis epilépticas disminuye la expresión de algunas subunidades como $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 4$ y $\gamma 1$ en las regiones donde se encuentra el foco epiléptico. Esto modifica la sensibilidad del receptor al GABA y a otros agonistas (Clark et al., 1994; Doble y Martin, 1996; Smith et al., 1998).

Trabajos previos señalan que los cambios en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ son fundamentales en la génesis de algunos tipos de epilepsias y en el inicio de las abstinencias a Bzs y neuroesteroides. Por ejemplo: los niveles de ARNm de esta subunidad se incrementan 4 h después de la primera crisis epiléptica inducida por kindling en la amígdala del lóbulo temporal (Clark et al., 1994). Crisis inducidas por ácido kaínico también muestran este fenómeno de *up-regulation* en la subunidad $\alpha 4$ (Tzunashima et al., 1997). Electrochoques repetidos también generan un incremento en la expresión del ARNm de esta subunidad (Clark, 1998). Además, durante la abstinencia a la alopregnanolona (aloP) y a la progesterona, aparece un incremento en la expresión de la isoforma $\alpha 4$. La terapia antisentido contra el ARNm de esta subunidad previene el síndrome de abstinencia a los neuroesteroides (Smith et al., 1998). En tanto que un tratamiento crónico con etanol induce una disminución en la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 6$ e induce un incremento de la $\gamma 3$ (Buck et al., 1991). Durante la abstinencia alcohólica se ha determinado también que las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 5$ disminuyen en su expresión en neuronas de corteza cerebral, además de que hay cambios en la fosforilación del receptor (Mhatre y Ticku, 1992). Un tratamiento prolongado con muscimol en cultivos de neuronas, reduce la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 1$ (Hirouchi et al., 1992); el tratamiento simultáneo con Bic bloquea este fenómeno. Las β -carbolinas, antagonistas del receptor GABA_A, inducen un incremento en la expresión de la subunidad δ del receptor GABA_A en cultivos de neuronas (Doble y Martin, 1996).

Un aspecto interesante que sustenta la hipótesis de este trabajo es el siguiente: Hay una gran diversidad de drogas que reconocen al receptor GABA_A y el tratamiento prolongado con sus agonistas genera cambios en la expresión de sus subunidades. También puede haber cambios en el número de receptores, disminuyendo su número (*down-regulation*) o incrementándolo (*up-regulation*). Esto debe modificar la sensibilidad farmacológica, lo que determina cambios en la excitabilidad del tejido. Ahora bien, el agonista por excelencia del receptor GABA_A es el mismo GABA, por lo que es lógico proponer que estos cambios debe de producirlos el GABA.

El balance de las evidencias disponibles de los cambios en las subunidades del receptor GABA_A después de tratamientos prolongados con agonistas, provee de una explicación molecular del desarrollo de tolerancias y abstinencias a las drogas GABAérgicas. El GABA mismo debería producir algunos de estos cambios.

Existen ajustes rápidos ante la exposición prolongada de un agonista al receptor GABA_A, la desensibilización es la primera consecuencia. Ante una concentración grande de un agonista, el receptor disminuye su actividad. A largo plazo, este fenómeno también depende de un cambio en la composición de las subunidades del receptor (Cash et al., 1997). La desensibilización depende del estado de fosforilación del receptor. Así, un incremento en los niveles de AMP_C o en la actividad de la PKA, ya sea al mismo tiempo o por separado, inducen una disminución en la actividad del receptor favoreciendo la desensibilización. Es decir, la fosforilación cambia los estados de apertura, la duración de apertura del canal y/o la afinidad al pegado del ligando al receptor GABA_A (Frosch et al., 1992; Laidenheimer y Chapell, 1997; Brown et al., 1998).

2.5 El Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG)

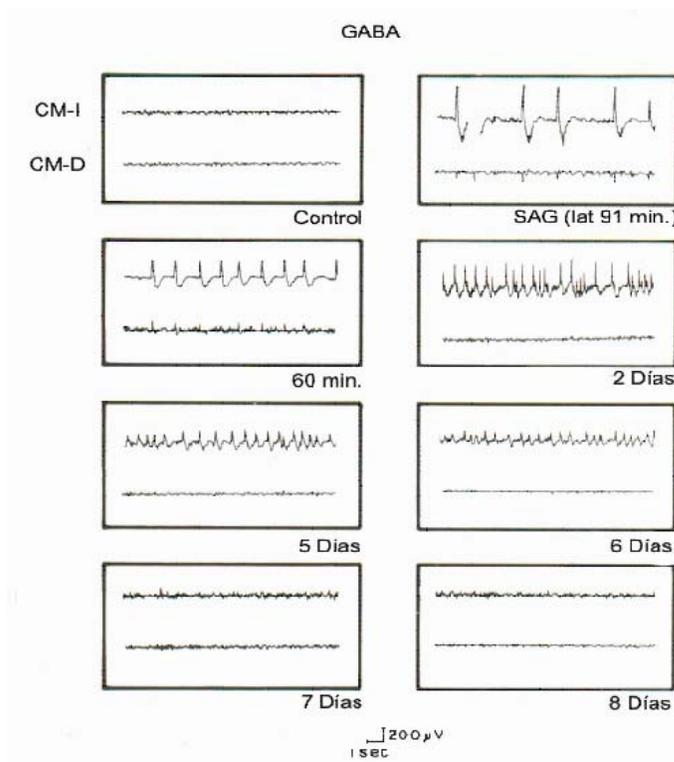
En el curso de una investigación sobre la relación entre el GABA y la epilepsia (Silva-Barrat et al., 1988) en la década de los ochentas, se demostró un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo a la interrupción del tratamiento con GABA en el mandril fotosensible (Brailowsky et al., 1987;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

En todos los monos, fotosensibles o no, en los que se administró el GABA, se constató la aparición de focos de actividad paroxística en el sitio de infusión al día siguiente de haber cesado el tratamiento. La cánula de infusión (utilizada también como electrodo de

registro) mostraba la presencia de poliespigas y de actividad en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora, se correlacionaba con la aparición de mioclonías del músculo inferior contralateral al hemisferio infundido. En algunos animales aparecieron convulsiones (Brailowsky et al., 1987; Brailowsky, 1991).

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

Figura 7



Electroencefalograma característico de un Síndrome de Abstinencia al GABA (SAG) en la rata. La interrupción de la infusión de GABA en la corteza somatomotora izquierda (CM-I) induce una actividad espiga onda con latencia promedio de 90 min, duración de 7 días (tomado de Calixto E et al., 1995).

Tanto en monos como en ratas, la interrupción abrupta de la infusión intracortical crónica de GABA fue seguida de la aparición de un foco epiléptico localizado en la zona infundida y caracterizado por descargas en forma de espigas (Fig. 7).

A este fenómeno de hiperexcitabilidad se le llamó “Síndrome de Abstinencia al GABA” (SAG; LeGal La Salle et al., 1988; Silva-Barrat et al., 1992), pues aparte de las

crisis convulsivas los animales mostraban otros signos clínicos tales como: mioclonus de la pata inferior contralateral al hemisferio infundido, movimiento incesante de las vibrisas, irritabilidad y aumento de la conducta exploratoria. Hay datos de dependencia física ya que la re-infusión de GABA hace que desaparezcan las manifestaciones EEG (Brailowsky, 1988). Finalmente, también hay datos de tolerancia cruzada a Bzs (Dz) y a barbitúricos (pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modifica la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica en las primeras 24 h (Brailowsky, 1992).

Las infusiones crónicas intracorticales del aminoácido impactan sobre la actividad de la GAD. Durante el SAG se manifiesta una reducción de aproximadamente 40% en la actividad de la GAD (Salazar et al., 1994).

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

3.- El proceso de Despolarización Inducida por Supresión de la Inhibición (DSI) o de la Excitación (DSE)

Los endocannabinoides son considerados mensajeros retrógrados que regulan la actividad sináptica de las neuronas, mediante la modulación de la liberación de neurotransmisores, su liberación es realizada por difusión a través de la membrana. Los endocannabinoides son lípidos de la membrana neuronal con gran capacidad de difusión. Los endocannabinoides juegan un papel importante en la plasticidad sináptica a corto y largo plazo, así como en el control directo de la tasa de disparo de células pre-sinápticas (Diana y Marty, 2004).

Durante la despolarización de las células post-sinápticas se incrementa en el interior de la membrana los niveles de Ca²⁺, esto provoca la síntesis y liberación de

endocannabinoides, por consecuencia la activación de receptores pre-sinápticos para cannabinoides tipo 1 (CB1), esta activación de receptores CB1 bloquea la entrada de Ca^{2+} pre-sináptico por tal motivo inhibe la liberación de GABA o glutamato, este evento es llamado despolarización inducida por supresión de la inhibición (Fig. 8, DSI por sus siglas en ingles) o despolarización inducida por supresión de la excitación (DSE), respectivamente. El DSI fue descubierto en las células de purkinje (Llano et al., 1991; Vincent et al., 1992) y en células piramidales del área CA1 del hipocampo (Pitler y Alger, 1992; 1994), recientemente se ha encontrado que también las células de la corteza pueden inducir DSI. La DSE fue recientemente descubierta en las células de purkinje (Kreitzer y Regehr, 2001) y en las células piramidales del área CA1 del hipocampo (Ohno-Shosaku et al., 2002). Por definición, la DSI (así como la DSE) son desencadenados por la despolarización post-sináptica, en el hipocampo la inducción de la DSI depende del incremento post-sináptico de Ca^{2+} (Freund et al., 2003), estos eventos (la DSI y la DSE) son completamente reversibles en un período de pocos segundos (Diana y Marty 2004; Lemtiri-Chlieh y Levine 2007; Ali, 2007).

Además de tener efecto en los receptores CB1, los endocannabinoides bloquean los canales voltaje dependientes para Ca^{2+} tipo N, P y Q, y pueden sobre regular las corrientes de K^+ provocando una reducción en la entrada de Ca^{2+} , por lo tanto reducen la liberación de neurotransmisores como el GABA o el glutamato (Ameri, 1999; Schillicker y Kathmann, 2001; Howlett et al., 2002).

En el hipocampo la activación de los receptores CB1 afecta mínimamente a las corrientes post-sinápticas inhibitorias miniatura, es decir no es capaz de inducir la DSI (Pitler y Alger, 1994), por tal motivo se ha sugerido que la DSI en el hipocampo es inducida por el bloqueo de los canales voltaje dependiente para Ca^{2+} tipo N, ya que estos canales modulan a las corrientes post-sinápticas inhibitorias dentro de las células de CA1, además solo las interneuronas que expresan los receptores CB1 y son positivas para colecistokinina son capaces de inducir DSI (Wilson et al., 2001).

La síntesis de endocannabinoides posiblemente es modulada por la activación de los receptores muscarínicos y receptores metabotrópicos para glutamato que están acoplados a la fosfolipasa C, esta enzima incrementa los niveles intracelulares del inositol 1,4,5-trifosfato y del diacilglicerol, este último es el precursor directo del 2-araquidonilglicerol

(2-AG). El 2-AG y la anandamida son los dos endocannabinoides moduladores de los receptores CB1 en el SNC (Di Marzo et al., 1998; Piomelli et al., 2000).

El DSI es un modelo de plasticidad sináptica de corta duración pero importante en los procesos de aprendizaje y memoria: un incremento de GABA favorece la despolarización post-sináptica. Esta contradicción fisiológica esta limitada en periodos cortos (ms) y en estructuras de amplia excitabilidad como la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo. De tal manera, el DSI, puede ser un mecanismo importante para la génesis de las abstinencias pero su efecto es nulo o limitado en los procesos de mantenimiento de las abstinencias por drogas GABAérgicas.

Figura 8

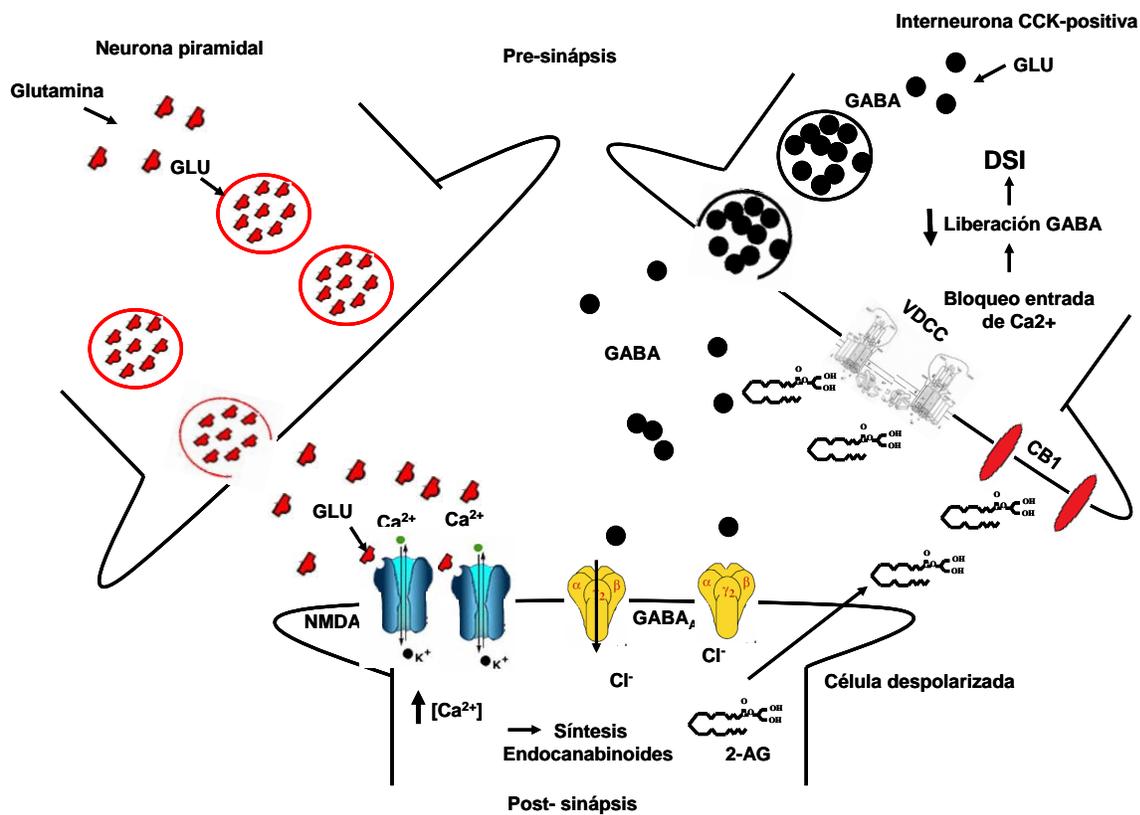


Diagrama que muestra el mecanismo molecular de la despolarización inducida por supresión de la inhibición (DSI). Arriba los botones pre-sinápticos que al ser estimulados liberan neurotransmisores (izquierda neurona piramidal libera glutamato, derecha, una interneuronas CCK- positiva libera GABA). El glutamato al interactuar con el receptor NMDA favorece el incremento de la concentración de Ca^{2+} provocando la despolarización de la membrana post-sináptica, este efecto induce la síntesis y liberación (por difusión) de endocannabinoides como el 2-araquidonylglicerol (2-AG) que activa a los receptores para cannabinoides tipo 1 (CB1) y bloquea a los canales voltaje dependientes para Ca^{2+} ($VDCC$, por sus siglas en inglés), lo que disminuye la liberación GABA, este evento es conocido como DSI.

4.- Bzs y Farmacología del Dz

4.1 Abstinencia a Bzs

En 1955, Sternbach sintetizó al clordiazepóxido, el patrón de acciones de este fármaco fue descrito por Randal (ver Martín, 1987). Pero fue hasta 1961 cuando el clordiazepóxido fue introducido en la clínica con el nombre de “librium”, marcando con ello el comienzo de la era de las Bzs (Sternbach, 1979). Hasta la fecha se han sintetizado más de 3000 compuestos benzodiazepínicos, de los cuales a 120 se les han probado su actividad biológica y cerca de 35 se encuentran en uso clínico. La mayor parte de las Bzs que se utilizan se han seleccionado por su alto potencial ansiolítico, capacidad de sedación, efectos anticonvulsivos y de relajación muscular, estos efectos se explican por su función depresora de la actividad del SNC (Shader y Greenblatt, 1981; Mark y Waltzman, 1999; Ribeiro et al., 2007). Las Bzs son fármacos que incrementan la actividad del receptor GABA_A, ejerciendo una modulación alostérica positiva en el receptor (Shader y Greenblatt, 1981; Llorente et al., 2000). La unión entre las Bzs y el receptor GABA_A tiene como resultado un incremento de las conductancias de Cl⁻. Esta facilitación de las conductancias de Cl⁻ inducidas por GABA resulta en una hiperpolarización de las neuronas, permitiendo una disminución de la transmisión sináptica (Squires, 1983; Mark y Waltzman, 1999). Los receptores GABA_A que contienen las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ en combinación con las subunidades β y $\gamma 2$, son los receptores más abundantes para este neurotransmisor; en el cerebro, los receptores con expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$, no responden clínicamente al Dz, flunitrazepam, clonazepam y zolpidem (Pirker et al., 2000; Moler, 2006). El efecto anticonvulsivo, sedativo, ansiolítico o hipnótico de las Bz es mediado por los receptores GABA_A cuya conformación se basa principalmente en las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Mohler et al., 2002; Mohler, 2006).

El fenómeno de disminuir la actividad del cerebro ocurre de manera dependiente de la dosis. Los efectos que inducen son: sueño, pérdida del conocimiento, anestesia, coma, y depresión de la actividad respiratoria y cardiaca. Estudios *in vivo*, indican que el efecto de las Bzs disminuye la actividad registrada durante el EEG en diferentes estructuras del cerebro (hipocampo, corteza, entre otras), en diversos modelos animales: gatos, ratones, monos, conejos, ratas, perros (Depoortere et al., 1983).

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

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

Los signos y síntomas más comunes de la abstinencia a las Bzs son la ansiedad y la agitación. Se incrementa la sensibilidad a la luz y al ruido, aparecen parestesias asociadas a sacudidas mioclónicas, se presentan trastornos del sueño y pueden mostrar mareos, inquietud e irritabilidad, así como una serie de signos neurológicos característicos, entre los que se incluyen: temblor, disartria, nistagmo y ataxia cerebelosa. Después de dosis altas de Bzs, el síndrome de abstinencia aparece con convulsiones y delirio (Doble y Martin, 1996). Es difícil distinguir entre los síntomas de la abstinencia y la reaparición de la ansiedad que motivó la prescripción de las Bzs.

Diversos estudios indican que tratamientos largos con Bzs disminuyen significativamente la expresión de las isoformas $\alpha 1$ y $\gamma 2$ del receptor GABA_A. Cuando los tratamientos son prolongados (mayores de 1 mes), se presentan cambios en la subunidad $\alpha 5$, reduciéndose su expresión mientras hay un incremento en las isoformas $\alpha 3$ y $\alpha 6$ (Doble y Martin, 1996).

4.2 Farmacología del Dz

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

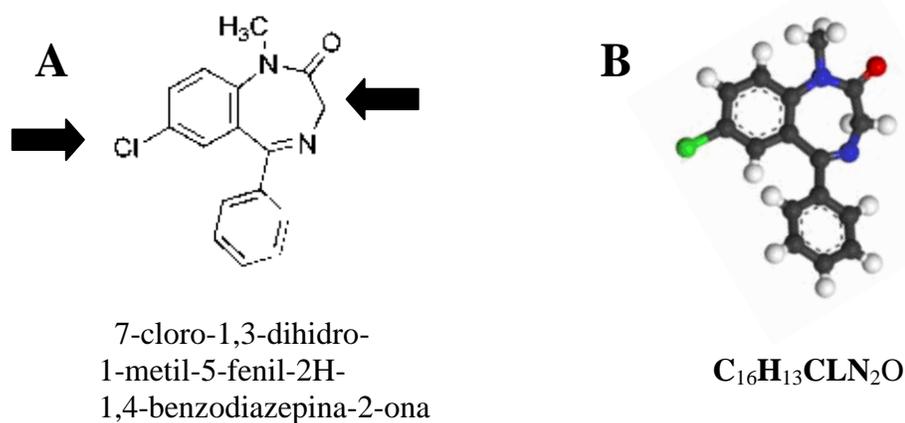
Se ha demostrado que la actividad registrada en el EEG, después de la aplicación de Dz, presenta un incremento en la actividad de ondas beta y un decremento de la actividad de ondas alfa o lentas, estos cambios en la actividad beta han sido correlacionados con su efecto anticonvulsivo (Mandema y Danhof, 1992; Jongasma et al., 2000). La administración

del Dz en el hombre incrementa los niveles de testosterona en el plasma y de corticoesterona en ratas, además en células glomerulosas adrenales bovinas inhibe la producción de aldosterona (Papadopoulos, 1993).

La síntesis del Dz se realizó en 1959 por los laboratorios Roche, y su ingreso al mercado comercial fue en 1963. Es un derivado de la 1-4 benzodiazepina, con nomenclatura IUPAC 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona, cuya fórmula empírica es $C_{16}H_{13}ClN_2O$ (Fig. 9; Mathey, 1965), su peso molecular es 284.75 kDa. Tiene un efecto menos tóxico y diez veces mas potente que el librium (Sternbach, 1979). La introducción en México del Dz fue hasta el año de 1968.

De acuerdo al criterio de la Convención de Substancias Psicotrópicas de la Organización Mundial de Salud en 1971, el Dz pertenece al grupo IV de fármacos controlados, el grupo IV denota sustancias cuya probabilidad de establecer abuso es pequeña pero significa un riesgo de abuso para la salud publica (WHO, 2003; Manchikanti et al., 2002).

Figura 9



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

El “*riesgo de abuso*” de un compuesto es la capacidad para producir una dependencia psicológica o fisiológica, en conjunto con la capacidad para alterar el

comportamiento de una forma que es perjudicial al individuo o a su ambiente social (Woods y Winger, 1997).

4.3 Farmacodinamia y farmacocinética del Dz

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

Esta Bz comienza a ser metabolizada por una N- desmetilización realizada por los citocromos P-450, P-3A4 y P-2C19 que se encuentran principalmente en el hígado, el N-desmetildiazepam es el metabolito farmacológicamente más activo, después es hidroxilado por el citocromo P-3A4 formando el metabolito activo, temazepam, al final ambos metabolitos son convertidos en oxazepam y son eliminados excretándose principalmente como conjugados glucorónicos por la orina (Goodman, 1996; Shader y Greenblatt, 1981; Olkkola y Ahonen, 2008;).

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

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

4.4 El síndrome de abstinencia a Dz

En la década de los 70's en los EUA se reportaron varios casos en los cuales la interrupción de un tratamiento prolongado con Dz producía un síndrome de abstinencia

caracterizado por: un exagerado nivel de ansiedad, insomnio, sudoración profusa, pesadillas, disforia, agitación, inestabilidad emocional, temblor, dolor de cabeza, vértigo, falta de coordinación motora, hipersensibilidad sensorial, letargo, fatiga, visión borrosa, sensación facial ardiente, dolor muscular, taquicardia, alucinaciones, psicosis, deliro y en ocasiones convulsiones. (Greenblatt y Shader, 1978; Shader y Greenblatt, 1981; Petursson y Lader, 1984; Lander, 1994; Doble y Martin, 1996; Mark y Waltzman, 1999; Baptista et al., 2007).

4.5 Modificaciones EEG y moleculares en la Abstinencia a Dz

Se sabe que el retiro abrupto de la administración de Dz en humanos altera la actividad cortical registrada a través del EEG, consecuencia de un incremento en la excitabilidad neuronal asociado con la ansiedad. Los cambios en el EEG se caracterizan por la disminución de las ondas de baja frecuencia durante el sueño. Dentro de la práctica clínica, el Dz es utilizado como auxiliar en el tratamiento para el Síndrome de Abstinencia al Alcohol (Vicens et al., 2006).

En ratas, la interrupción de tratamientos prolongados con Dz genera la aparición de irritabilidad, conducta de miedo y crisis convulsivas; además de cambios moleculares en el receptor GABA_A tales como: la disminución en la densidad de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ además de un incremento en la expresión del RNAm de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\gamma 2L$, $\gamma 2S$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en neuronas de la corteza cerebral y el hipocampo (Impagnatiello et al., 1996; Pesold et al., 1997), estos cambios modifican la función del receptor provocando la reducción del efecto del Dz (Follesa et al., 2001; 2003; 2004). Sin embargo, en la búsqueda de nuevas alternativas para estudiar el origen de las abstinencias a Bzs, recientemente se ha demostrado que el sistema glutamatérgico también se encuentra modificado. Durante la abstinencia a Dz, hay cambios en la conformación de los receptores para glutamato, estos cambios son asociados con un incremento tanto en el número como en función de los receptores AMPA y una reducción (*down-regulation*) de los receptores NMDA. El incremento en la función del receptor AMPA esta correlacionado con la sobreexpresión de la subunidad Glu1 (subunidad esencial para la plasticidad neuronal; Izzo et al., 2001; Allison et al., 2005). Estos mismos cambios en la neurotransmisión glutamatérgica se han

encontrado en la abstinencia a flurazepam (Bz 10 veces menos potente que el Dz; Van Sículo et al., 2004; Son et al., 2007; Xiang y Tietz, 2007). No obstante, se ha cuantificado que dependiendo de la forma de administración del Dz en un tratamiento, los cambios en la abstinencia son paradójicamente diferentes, ya que la administración vía IP provoca en la abstinencia una reducción de la tasa del pegado en el receptor AMPA, es decir *down-regulation* de este receptor, caso contrario con la administración subcutánea, en este modelo incrementa la tasa de unión al mismo receptor AMPA, este efecto puede ser una respuesta neuroadaptativa hacia un incremento en la actividad excitatoria (Allison y Judith, 2006; Steppuhn y Turski, 1993).

III Justificación

El consumo de Bzs en la población de nuestro país comienza entre los 12 y 65 años, un cálculo epidemiológico importante es que: el 10% del total de la población de México ingiere o tuvo contacto con Bzs y de acuerdo a la Encuesta Nacional de Epidemiológica Psiquiátrica en México, el uso de estas sustancias en la región sur-centro del país llega al 36%. Lo anterior se resume en un problema latente de salud pública, que ha generado la búsqueda de una estrategia farmacológica para contrarrestar la mayoría de los riesgos y problemas ocasionados por el uso y abuso del Dz, así como de otras sustancias con actividad GABAérgica (Encuesta Nacional de Adicciones del 2002). Por tal motivo la principal justificación de la presente tesis es analizar en un modelo animal el conocimiento acerca de los cambios neuronales que produce la abstinencia a Dz en la neurotransmisión GABAérgica. De tal manera que los resultados obtenidos nos ayudaran a entender los mecanismos que producen y mantienen al síndrome de abstinencia a Dz, además con esto proponemos apoyar a futuras investigaciones clínicas o epidemiológicas.

La justificación de utilizar las drogas para este trabajo es la siguiente: en el apartado de las Bzs se utilizará el Dz, debido a una premisa clínica: es la sustancia GABAérgica más utilizado clínicamente a nivel mundial, por tal motivo es el fármaco de mayor inducción de síndromes de abstinencia y este estado es inducido a muy cortos periodos de exposición.

IV Objetivos

- Identificar las modificaciones en la excitabilidad neuronal provocadas por la abstinencia a Dz, mediante registros EEG (*in vivo*) y registros del fEPSP (*in vitro*) en la región CA1 del hipocampo de rata.
- Analizar los cambios en los niveles de ansiedad provocados por la abstinencia a Dz, mediante la prueba del laberinto elevado en cruz.
- Evaluar la susceptibilidad a inducir crisis convulsiva por aplicación de PTZ en ratas con abstinencia a Dz
- Evaluar la sensibilidad farmacológica de las rebanadas provenientes de ratas que manifestaron abstinencia a diazepam, mediante la exposición de GABA y del antagonista bicuculina.

V Hipótesis

Proponemos que la abstinencia a Dz modificará las propiedades farmacológicas del receptor $GABA_A$, favoreciendo un incremento de la excitabilidad neuronal. Este incremento en la actividad neuronal es posible relacionarlo con tres diferentes niveles: medición de la excitabilidad de la corteza cerebral en animal integro y del área CA1 del hipocampo en rebanadas de cerebro, ambos eventos deben tener una relación proporcional a los niveles de ansiedad del animal, lo cual tiene a su vez una relación inversa con el umbral de inducción de crisis convulsivas.

VI Material y Métodos

Esta tesis realizó 4 técnicas distintas pero complementarias entre ellas: 1) registro de la actividad EEG; 2) cuantificación de cambios conductuales en los animales a través de la medición de la ansiedad en el laberinto elevado en cruz (LEC); 3) preparación de rebanadas de cerebro para medir la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo y 4) medición de los cambios al umbral de génesis de crisis epilépticas por pentilenetetrazol (PTZ). Identificamos que la abstinencia a Dz se manifiesta como un incremento en la actividad neuronal valorable en diferentes formas: aparición de complejos espiga-onda en el EEG, aparición de ansiedad, un incremento de la actividad sináptica del hipocampo y una reducción al umbral de inducción de crisis convulsivas.

Para la realización de la presente tesis se utilizaron 52 ratas macho de la cepa Wistar (250-300g) provenientes del bioterio del INPRF y mantenidas en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25° C), alimento *ad libitum*, bajo un ciclo de luz oscuridad invertido (12 x 12 h) y de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Academia Nacional de Medicina (1999).

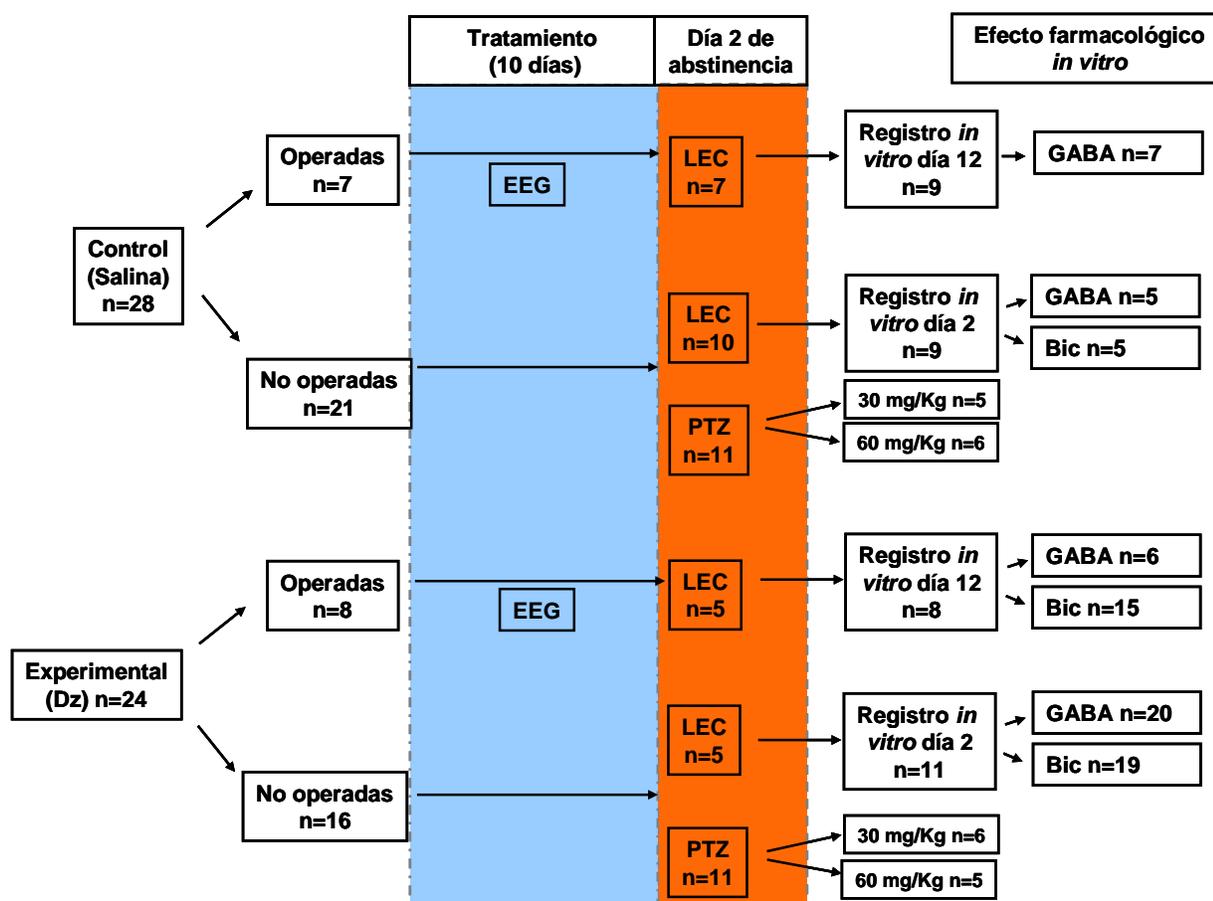
Los 52 animales fueron divididos para el diseño experimental de la siguiente forma (cuadro 1): 28 para grupo control (tratamiento con salina) y 24 animales para el grupo experimental (tratamiento con Dz por 10 días).

La secuencia de los grupos experimentales fue a su vez dividirlos en 2 subgrupos: uno de ratas operadas para registro de EEG (estereotaxia para implante de electrodos epidurales) y valorar el tratamiento durante y después de la aplicación de Dz (n=8). De estos animales, sólo 5 llegaron a la cuantificación del perfil ansiogénico valorado por el LEC, esto se debió a que 3 animales perdieron el complejo de electrodos-conector durante el tratamiento. De estos 5 animales, los cuales todos manifestaron abstinencia a DZ, fueron preparados para obtener de sus cerebros rebanadas y obtener de ellos registros *in vitro* (n=8). Otro grupo de animales, no fueron sometidos a cirugía, pero recibieron el mismo tratamiento crónico de Dz (n=16), de estos, 5 animales, se les cuantificó el LEC y se obtuvo de ellos los mismos valores de la actividad ansiogénica que el grupo de animales operados, los resultados indicaron que no hay diferencia en el perfil ansiogénico entre ratas operadas y no operadas. Los 11 animales restantes –no operados pero con abstinencia a Dz- fueron

tratados con pentilenetrazol (PTZ) divididos a su vez en 2 subgrupos: uno recibió dosis de 30 mg/Kg (n=6) y el otro de 60 mg/Kg (n=5).

Los grupos control los cuales se les aplicó vía IP sol. Salina por 10 días y en ese tiempo se registró el EEG; todos estos tuvieron una secuencia semejante al diseño experimental: 7 animales fueron operados y evaluados en el LEC; sus cerebros fueron utilizados para registrar la actividad sináptica en rebanadas (n=9, es necesario indicar que en un cerebro se realizó registro en 2 rebanadas, por ello, la n es más grande). Otro grupo de animales no fueron operados (21) de los cuales 10 fueron evaluados en el LEC y se les realizó preparación de rebanadas de cerebro (n=9). En otra serie de experimentos, 11 animales con abstinencia a Dz fueron sometidos a la aplicación de PTZ a las dosis de 30 mg/Kg (n=5) y el otro de 60 mg/Kg (n=6).

Cuadro 1



Resumen de los grupos de trabajo con sus animales totales. En azul se representa el tratamiento crónico (10 días) de diazepam o salina vía IP. En naranja, las pruebas: conductual (LEC) o la medición de la latencia a las crisis epilépticas inducidas por PTZ a los animales con el tratamiento crónico. Así como, los animales de los que fueron preparados sus cerebros para la obtención de las rebanadas.

VI. 1 Experimentos *in vivo*

VI.1.1 Cirugía Estereotáxica

La primera serie de experimentos fue realizada para identificar los cambios EEG de la abstinencia al Dz en la rata. Datos previos a esta tesis, muestran que el retiro abrupto de la administración crónica intracortical de GABA (Calixto et al., 1995) induce la aparición de complejos espiga-onda asociada a una conducta de hiperexcitabilidad neuronal. Nosotros desconocíamos si la administración IP de Dz y su abstinencia tendrían efectos de modificar la actividad electroencefalográfica. Por ello, fue necesario realizar una cirugía estereotáxica para colocar electrodos y preparar estos animales para registro crónico de EEG.

La cirugía fue realizada en animales anestesiados con pentobarbital sódico (33 mg/Kg de peso; Anestosal®), a los cuales les fueron colocados electrodos de acero, epidurales en ambos hemisferios craneales (mediante un sistema estereotáxico, ASI Instruments; en la corteza frontal [CxF] y somato motora [CxS]); terminales de cobre de cada electrodo se soldaron a un conector, el complejo electrodos-conector fueron fijados al cráneo con cemento acrílico (Fig. 10). Después de una semana de recuperación quirúrgica y de habituación a las condiciones de registro, se realizó un EEG en condiciones de control.

Las ratas operadas se dividieron en dos grupos: al grupo a) se le inyectó diariamente vía IP solución salina (NaCl al 0.9%; n=7) durante 10 días; otro grupo, b) recibió inyecciones vía IP de Dz (7mg/Kg; n=8), también durante 10 días. Todas las inyecciones se realizaron en el horario de 10-10:30 am. En ambos grupos, se realizó el registro del EEG por 30 min, en los días 1, 5 y 10 del tratamiento, con el fin de analizar los cambios provocados por la administración de salina o Dz. Al concluir el tratamiento de 10 días con salina o Dz, las ratas fueron llevadas al registro EEG diariamente por 120 min para cuantificar la actividad cortical de la abstinencia los siguientes 7 días después de la interrupción del tratamiento.

Los registros EEG fueron obtenidos mediante un amplificador (GRASS, modelo p5), la señal eléctrica de cada hemisferio cerebral fue digitalizada en paralelo a través de una interface analógica-digital (Digidata 1200, Axon Instruments), cada registro fue visualizado, guardado y analizado en una computadora utilizando para ello el programa pClamp V8.2 de Axoclamp Instruments.

Los registros EEG se analizaron para identificar: 1) el incremento rápido y reversible de la actividad basal EEG característica de la aplicación de Dz (Fig. 14B). 2) La latencia de aparición de descargas epileptiformes y 3) el número de complejos espiga-onda durante los 7 días después del retiro del Dz (Fig.14 D y E). Se realizó un análisis estadístico de la desaparición de la actividad epileptiforme entre el primer día de la abstinencia comparados con los siguientes 6 días subsiguientes, para ello se utilizó la prueba t de Student (pareada y no pareada con un nivel de significancia asignado para p de ≤ 0.05).

Figura 10

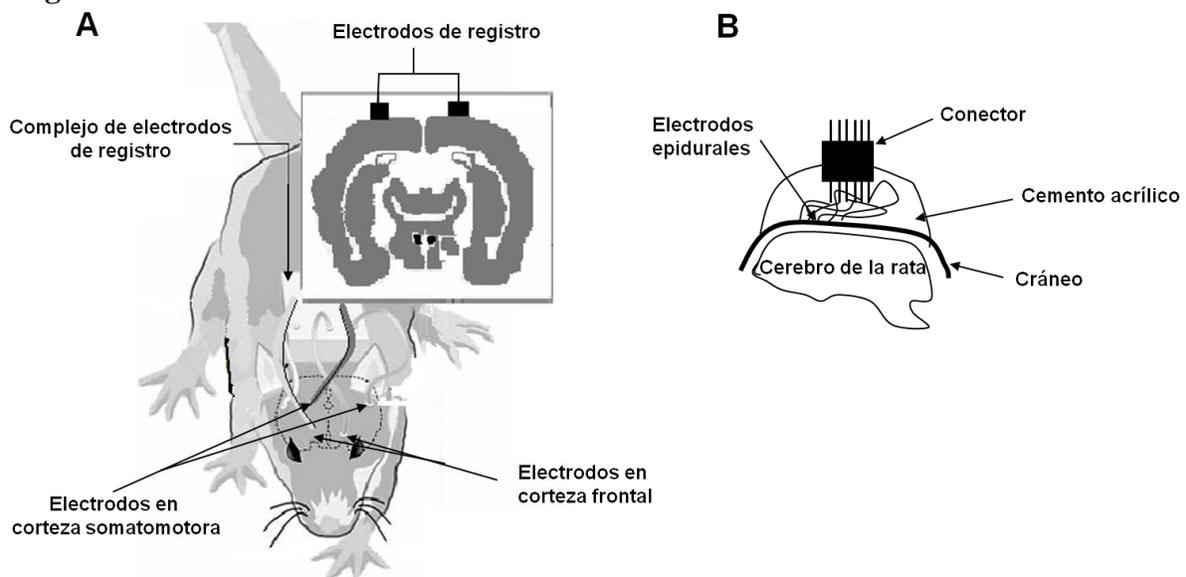


Diagrama de la colocación de los electrodos epidurales en la rata. A) Imagen de una rata, en la que se observa el lugar de colocación del complejo de electrodos. B) Esquema que muestra el circuito de conexión entre los electrodos y el conector, para ser utilizados en el registro del EEG.

VI.1.2 Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC)

¿Los animales en condiciones de abstinencia a Dz tienen ansiedad?, para responder este cuestionamiento utilizamos la prueba del LEC. El LEC es una prueba utilizada ampliamente para medir ansiedad y efectos ansiolíticos provocados por drogas (Rodgers y Dalvi, 1997), la valoración más importante de esta prueba es la que si una rata presenta ansiedad entra más veces y permanece más tiempo en la porción del laberinto que tiene paredes (brazos cerrados o BC).

Durante el segundo día de abstinencia (48 h después de la última aplicación de salina o Dz) se realizó la prueba del LEC. El LEC consiste en dos brazos opuestos llamados

brazos abiertos (BA; 50 x 10cm cada uno), y dos con las mismas dimensiones pero con paredes de 40cm de alto denominados BC, los cuatro brazos se encuentran conectados por un cuadro central de 10 x 10cm, el LEC se encuentra elevado 50 cm del piso (fig. 11). Esta prueba se realizó en una habitación iluminada con luz roja de 40 watts, para ratas que recibieron tratamiento con salina (n=17) y para el grupo que recibió Dz (n=10); para evitar el proceso de habituación y/o de aprendizaje de la tarea, el animal fue sometido a la prueba una sola vez por 10 min. La ejecución de la prueba consistió en colocar al animal en el punto central del LEC mirando hacia uno de los BA. Luego del tiempo de observación directa se evaluó: a) el número de ingresos a los BA, y b) el tiempo de permanencia en ellos (min). Cada prueba fue grabada en video con el objeto de minimizar la variabilidad del análisis.

Los datos obtenidos del número de entradas a BA/BC y la permanencia en cada uno de ellos fueron comparados entre el grupo con abstinencia a Dz contra el grupo control fueron analizados con una prueba estadística de t de Student ($p \leq 0.05$).

Figura 11

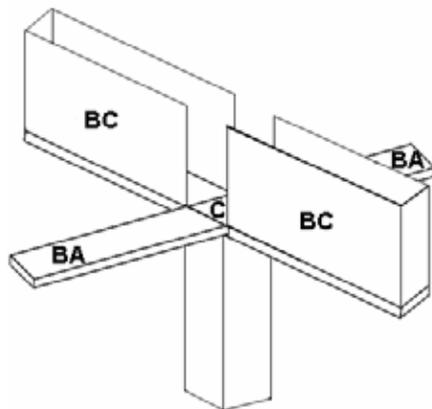


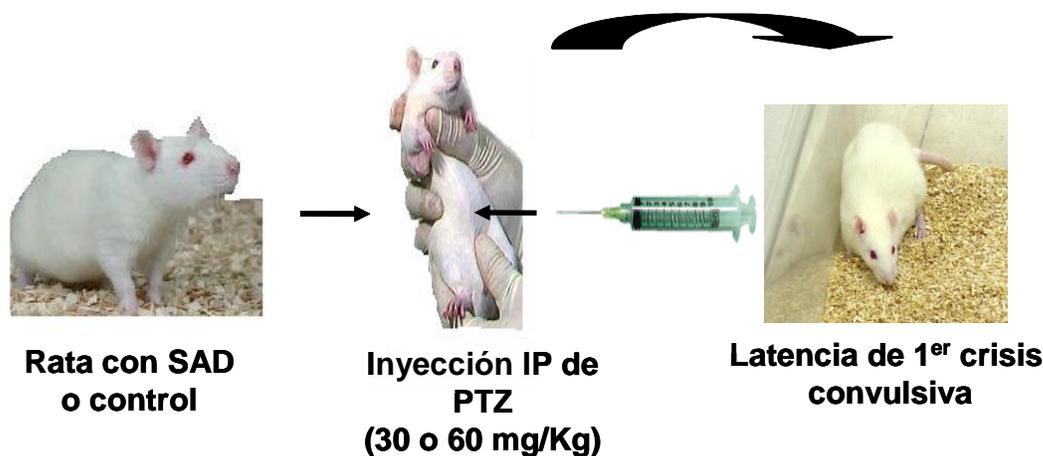
Diagrama tridimensional de un laberinto elevado en cruz (LEC). (BA) Representan los brazos abiertos, cuyas dimensiones son 50 x 10 cm cada uno. (BC) son los brazos cerrados que tienen paredes elevadas a 40 cm, con las mismas dimensiones que BA, (C) cuadro central de 10 x 10 cm que une a los cuatro brazos, el LEC se encuentra a 50 cm del piso.

VI.1.3 Inducción de crisis convulsivas por PTZ

La siguiente serie de experimentos fueron encaminados a responder si este nuevo estado en la excitabilidad cerebral reduce la sensibilidad de inducción de crisis convulsivas. Para ello, utilizamos al pentilenetetrazol o PTZ, el cual es un potente bloqueador de la

actividad GABAérgica y en consecuencia: un inductor de crisis epilépticas (Hansen et al., 2004). Datos farmacológicos previos indican que la dosis efectiva de inducción de crisis convulsivas es de 60 mg/Kg. Una reducción de la concentración de éste fármaco (30 mg/Kg) es una dosis sub-umbral: la probabilidad de inducción es menor al 20 % de los casos (Medeiros et al., 1997; Zhang et al., 2006; Ali et al., 2005; Palencia et al., 2007). Debido a que los experimentos de esta tesis muestran que la abstinencia a Dz genera un incremento en la excitabilidad neuronal, es factible proponer que en el estado de hiperexcitabilidad se cuantifique un incremento en la sensibilidad farmacológica a PTZ, valorándolo en dos formas: a) un agravamiento en la respuesta a la dosis de 60 mg/Kg y b) un incremento en el efecto convulsivo de la dosis de 30 mg/Kg, en ambos casos valorando la latencia de la 1^{er} crisis convulsiva (tiempo en segundos).

Figura 12



Administración IP de PTZ en la rata para inducir crisis convulsivas, en esta prueba se analiza la latencia en que se presenta la primera crisis convulsiva después de inyectar PTZ.

Dosis de PTZ 60 mg/Kg

Grupo 1

Control (salina)

(n=6)

Grupo 2

Abstinencia a Dz (día 2)

(n=5)

Dosis de PTZ 30 mg/Kg

Grupo 3

Control (salina)

(n=5)

Grupo 4

Abstinencia a Dz (día 2)

(n=6)

Los grupos de estudio de esta serie fueron divididos en 4 subgrupos de animales no operados pero que recibieron el tratamiento crónico de salina o de Dz: grupo 1) control (inyectados con salina durante 10 días; n=6) a los que se le aplicó la dosis de 60 mg/Kg de PTZ; grupo 2) abstinencia a Dz (tratamiento de 10 días y medido al día 2 del retiro abrupto) a los que se les aplicó la dosis de 60 mg/Kg (n=5); grupo 3) control de salina (inyectados con salina durante 10 días; n=5) a los cuales se les aplicó PTZ a dosis de 30 mg/Kg y finalmente, grupo 4) abstinencia a Dz (tratamiento de 10 días y valorado al día 2 del retiro abrupto; n=6 a los que se les aplicó dosis de 30 mg/Kg (Fig. 12). El análisis estadístico corresponde a la aplicación de una t de student no pareada comparando los tiempos en segundos de la latencia a la primera crisis convulsiva.

VI.2. Experimentos *in vitro*

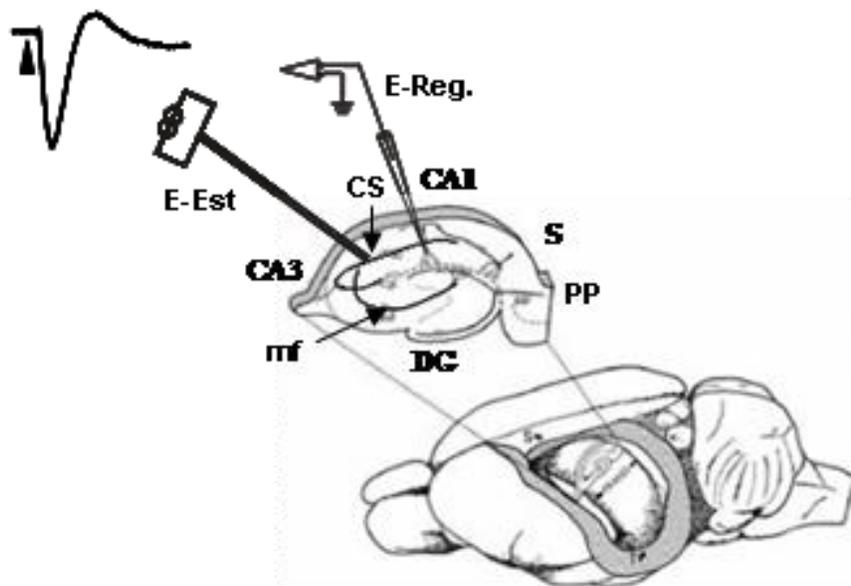
Datos previos de nuestra línea de investigación muestran que los fenómenos de hiperexcitabilidad en el animal integro pueden cuantificarse en condiciones *in vitro* (Calixto et al., 2000). El registro de la actividad sináptica de la rebanada de cerebro garantiza la conservación de los componentes sinápticos y una identificación precisa de los elementos y estructuras del cerebro; garantizando con ello, un control específico de la estimulación en fibras/ axones así como de las regiones o núcleos de registro. Debido a que identificamos *in vivo* un incremento importante de la actividad EEG, la propuesta de estudiar las rebanadas de cerebro de estos animales fue para cuantificar la magnitud de la hiperexcitabilidad de la abstinencia a Dz en el componente sináptico a corto y mediano plazo (día 2 y 12 de abstinencia).

En esta serie de experimentos, utilizando otro grupo de ratas sometidas al tratamiento con Dz (valorado en el día 2 y 12 de abstinencia) así como solución salina (tratamiento de 10 días), los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso; Anestosal®), después fueron perfundidos con un catéter a nivel del ventrículo izquierdo del corazón con una solución a base de sacarosa a temperatura de 4 °C, (composición en mM: sacarosa 229, KCl 2.0, glucosa 10, Na₂HCO₃ 26, NaH₂P0₄ 1.2 y MgCl₂ 1.5), burbujeada con una mezcla 95% O₂/ 5% CO₂ para mantener un pH constante de 7.4.

Al término de la perfusión, el cerebro fue extraído rápidamente. Cada hemisferio se seccionó en un vibratomo (pelco M-101) en cortes sagitales de 400 μm de grosor a temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$ (fig. 13). Las rebanadas se mantuvieron en una solución salina semejante en composición al líquido cerebro espinal (concentración en mM): NaCl 125, KCl 2.0, MgCl₂ 6.0, CaCl₂ 1.0, glucosa 11, NaHCO₃ 26, en burbujeo continuo con la mezcla de gases (95% O₂ / 5% CO₂) ajustado a un pH de 7.4 con una osmolaridad de 300 mOsmol/l.

Para el registro de la actividad electrofisiológica, cada rebanada fue colocada en una cámara de perfusión continua (2.5 ml), a temperatura ambiente y con una velocidad de perfusión de 2 ml/min. La solución de registro estándar contenía (concentración mM) NaCl 125, KCl 3.0, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 2.5, Na₂HP0₄ 1.2, glucosa 11, NaHCO₃ 26, en burbujeo continuo con (95% O₂ / 5% CO₂) y pH de 7.4.

Figura 13 fEPSP



Esquema del SNC y localización anatómica del hipocampo de rata. El hipocampo está estructurado en una conexión trisináptica: la información de la corteza cerebral ingresa al hipocampo a través de la vía perforante (PP) haciendo sinapsis en el giro dentado (DG), cuyas células envían sus axones al área CA3, formando con ello las fibras musgosas (mf). Los axones de las neuronas de CA3 hacen sinapsis en el área CA1, su proyección es a través de las colaterales de Shaffer (CS); sobre las cuáles en nuestra preparación de rebanada, se inyectaron los estímulos cuadrados con un electrodo bipolar (E-Est). La actividad sináptica de CA1 (fEPSP, inserto del ángulo superior izquierdo) fue registrada por un electrodo de registro (E-Reg) conectado a un amplificador de señales bioeléctricas. CA1 proyecta su información nuevamente a la corteza cerebral a través del subículo (S).

Los protocolos farmacológicos y los registros de los potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSP, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo en el área CA1 del hipocampo, en el *stratum radiatum*, por medio de micropipetas de vidrio llenas con solución de NaCl al 0.9% (2-4 M Ω ; E-Reg de la Fig.13; amplificador Axoclamp 2B, axon instrument). Los fEPSPs fueron digitalizados y almacenados en computadora utilizando el programa pClamp V9.2 de Axoclamp Instruments. Los estímulos para provocar los fEPSPs se realizaron con un electrodo bipolar concéntrico en las colaterales de Shaffer mediante pulsos cuadrados de voltaje únicos (0.40-1.0 ms a 0.1Hz; estimulador Grass S-11, unidad de aislamiento Grass PSI U6), así como con pulsos pareados: 10 a 60 ms en intervalos crecientes de 10 ms. La intensidad de estimulación se ajustó para todos los experimentos para obtener un fEPSP con amplitud del 50-60% de la amplitud máxima. Estos protocolos no indujeron depresión o espigas múltiples, ni potenciaron la respuesta en las condiciones control.

Los grupos que se realizaron fueron:

- 1) Grupo control (rebanadas provenientes de ratas con administración previa de solución salina día-2 n= 9 y día-12 n=9)
- 2) Rebanadas provenientes de ratas en abstinencia a Dz durante el día 2 (SAD-día 2 n=11)
- 3) Rebanadas provenientes de ratas que se encontraban en abstinencia a Dz durante el día 12 (SAD-día 12 n=8)
- 4) Grupo en el que se verificó el efecto del GABA (5 mM) en las rebanadas del grupo control (n=12), en SAD-día 2 (n=20), en SAD-día 12 (n=6)
- 5) Grupo en el que se verificó el efecto de la Bicuculina (Bic; 20 μ M) en las rebanadas del grupo control (n=5), en SAD-día 2 (n=19), en SAD-día 12 (n=15)

Para la obtención de los fEPSP de los tres primeros grupos se realizó una inyección de pulsos cuadrados únicos con la misma frecuencia e intensidad (anteriormente descrita) durante 3 horas. El grupo 1 no mostró cambios en la actividad sináptica registrada, mientras el grupo 2 mostró un incremento mayor en la excitabilidad sináptica en comparación con los registros de los grupos 3 y 1. La justificación de haber realizado el grupo 4 obedece a lo siguiente: la máxima hiperexcitabilidad neuronal producida por

abstinencia a un tratamiento crónico de Dz puede corroborarse después de 1 h de registro, el interés principal de realizar este grupo fue cuantificar la sensibilidad farmacológica para el GABA (durante 10 min), en estas nuevas condiciones de hiperexcitabilidad, se observó que en SAD día-2 el efecto producido por la superfusión de GABA es ligeramente menor que el obtenido de registros control. Después de un lavado de 30 min posterior a la superfusión del GABA la amplitud del fEPSP regresó a lo registrado antes de aplicar el GABA, fue aquí que se cuantificó la sensibilidad a Bic (grupo 5), sin embargo, para evitar un efecto de saturación (*ceiling*) en la amplitud de la respuesta, la intensidad del estímulo fue ajustada nuevamente (disminuida) para obtener una respuesta semejante a la amplitud del fEPSP inicial (50-60% de la amplitud máxima). Para el análisis de cada experimento (control, hiperexcitabilidad producida por abstinencia a un tratamiento crónico con Dz (SAD día-2 y SAD día-12), a todos los grupos se normalizó al 100% el valor de amplitud promedio de los fEPSPs de los 10 min iniciales de cada experimento o línea base. Para evaluar el efecto de la Bic (control, SAD día-2 y SAD día-12), se normalizó al 100% el promedio de la amplitud antes de la aplicación del antagonista (15-20 min previos a la exposición de Bic). El análisis estadístico se llevó a cabo validando la diferencia entre los promedios normalizados de la amplitud de los fEPSPs \pm su error estándar, identificando el porcentaje de cambio en esta amplitud en el curso temporal de los experimentos. Utilizando la prueba t de student (pareada y no pareada, según el caso) y la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney, considerando una significancia al valor de $P \leq 0.05$.

Las drogas y sales utilizadas en este trabajo fueron adquiridas a Sigma-Aldrich (St. Lois, MO. USA), exceptuando a la sacarosa y glucosa de laboratorios Hycel de México; CaCl_2 de laboratorios JT-Baker de México, el NaH_2PO_4 de Merck (Alemania) y el Dz que fue comprado directamente a los laboratorios Roche de México.

VII Resultados

VII. 1 Efectos de la abstinencia al Dz en la excitabilidad cortical.

La primera serie de experimentos estuvo orientada a identificar al EEG la hiperexcitabilidad neuronal de la corteza cerebral generada por la abstinencia de Dz. De esta manera, una semana después de la cirugía estereotáxica, previo a cualquier tratamiento farmacológico, a cada animal de experimentación se le cuantificó la actividad EEG control (0.1-300 Hz) de las CxF y CxM (Fig. 14A). La presencia de anomalías en el EEG (espigas, ondas lentas, etc.) fueron criterios para descartar a algunos animales del presente estudio.

Después de este primer registro electrofisiológico, se inició el tratamiento crónico con Dz (7 mg/Kg/24h, vía IP; durante 10 días; N=8). La aplicación de esta Bz fue protocolizada con horario. El registro de la actividad de ambas cortezas cerebrales durante 30 min posterior a la aplicación de Dz, reveló la inducción de actividad cortical sugerente de sueño asociada a la aparición de una actividad rápida y sincrónica relacionada a una conducta de masticación del animal, lo cual es característico de algunos agentes anti-epilépticos de actividad GABAérgica (Fig. 14B). El seguimiento de la evolución temporal de los registros EEG de la aplicación de Dz de los días 2 al 10 no mostró cambios en los patrones de frecuencia ni en la amplitud de la actividad EEG cortical (Fig. 14C).

La interrupción del tratamiento con Dz indujo manifestaciones EEG de un síndrome de abstinencia. Un día después de la última aplicación IP de la Bz, en todas las ratas se cuantificó la aparición de descargas epileptiformes, caracterizadas por complejos espiga-onda espontáneos de gran amplitud (200-300 μ V) y de alta frecuencia (0.15 a 0.2 Hz), identificados en mayor proporción en la CxS (Fig. 14D).

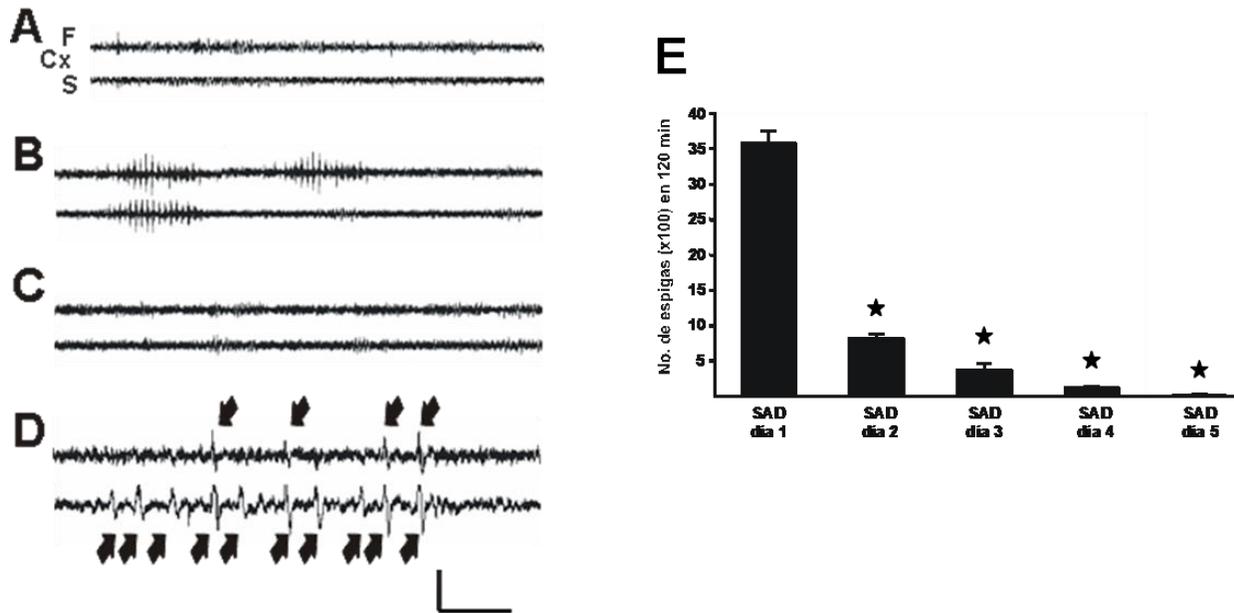
El número de estos complejos espiga-onda durante 120 min de registro en el primer día del síndrome de abstinencia a Dz (SAD día 1) fue de 3574 ± 170 complejos (Fig. 14). La frecuencia de las descargas paroxísticas en este estado de abstinencia fue reduciendo gradualmente hasta desaparecer por completo al día 5 después de la interrupción de la administración de Dz (Fig.14E).

Estos datos indican que la aplicación y la consecuente interrupción de Dz inducen un incremento transitorio de la actividad cortical, evento semejante al que generan otros agonistas del receptor GABA_A, como el mismo GABA y el clonazepam (Brailowsky et al.,

1988, Calixto et al., 1995). Debido a que el día 1 y 2 de la abstinencia coinciden con la mayor manifestación del incremento de la excitabilidad neuronal, el siguiente objetivo de esta tesis fue identificar el estado clínico del animal en etapas tempranas del SAD valorado a través de la medición de los niveles de ansiedad en una prueba conductual que se detalla a continuación.

Figura 14

SÍNDROME DE ABSTINENCIA A Dz (SAD)



Síndrome de abstinencia a Dz (SAD) en rata. A-D se muestran registros EEG representativos de un animal con manifestaciones de la hiperexcitabilidad cortical como resultado de la interrupción de la administración de Dz. (A) Registro control de las cortezas (Cx) frontal (F) y somatomotora (S). El gráfico B es el registro a los 5 min., posterior a la aplicación de Dz. (C) Indica la pérdida de la actividad de Dz (tolerancia) cuando se ha administrado durante 7 días. (D) La interrupción de la aplicación de la Bz genera la aparición de descargas epileptiformes (flechas negras), con mayor actividad en la región somatomotora. (E) El número de estas espigas disminuye en el curso temporal de la abstinencia (n=8). La calibración hace referencia a 100 μ V/ 1 seg.

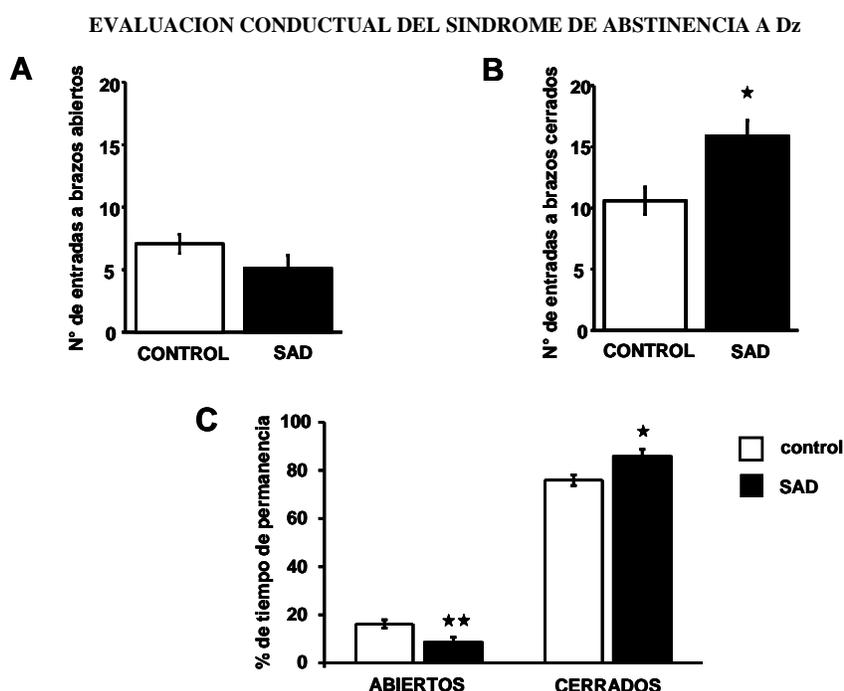
VII. 2 Estudio conductual de la abstinencia a Dz: manifestación de ansiedad durante el síndrome de abstinencia.

Para estudiar la conducta de los animales durante los primeros estadios de la abstinencia a Dz utilizamos el LEC estandarizado para roedores. En condiciones control, la generalidad de los animales muestran preferencia por los brazos cerrados (BC), aventurándose sólo esporádicamente a explorar los brazos abiertos (BA), donde el sujeto se encuentra más expuesto y vulnerable a caerse. La validez de esta prueba que sustenta y

justifica su utilidad en el presente trabajo es la siguiente: el animal que permanece o entra en los BC del laberinto es debido a que encuentra en un estado de ansiedad.

El estudio conductual en el LEC mostró que el grupo de animales en el día 2 de abstinencia al Dz manifestaron un perfil ansiogénico (n=10; barras negras de la Fig. 15). Estos animales que en el EEG tienen una gran actividad epileptogénica, en el LEC visitaron con una menor frecuencia los BA (Fig. 15A), asociado a un mayor número de entradas a los BC (Fig. 15B, $P < 0.04$), además de que permanecieron en los brazos abiertos (Fig. 15C) un tiempo significativamente inferior respecto de los animales control (n=17; $p < 0.02$).

Figura 15



Perfil ansiogénico de animales con abstinencia a Dz. Ejecución en el LEC en tres de sus variables cuantificables: A) el número de entradas a BA y B) el número de ingresos a BC. En C), se representa el tiempo de permanencia de los animales en algunos de estos dos brazos. El grupo de animales en abstinencia a Dz (SAD; barras negras, n=10) identifica que la manifestación clínica de la abstinencia es la ansiedad: los animales prefieren estar más tiempo y entrar con mayor frecuencia a los brazos del laberinto resguardados, comparándolos con el grupo control (barras blancas, n=17) y, la diferencia entre ambos grupos fue significativa: ** $P < 0.02$, * $P < 0.04$

Estos resultados revelan que el estado de hiperexcitabilidad inducido por la abstinencia a la Bz se asocia a un importante grado de ansiedad cuando los animales se enfrentaron a un entorno desconocido. Ambos eventos indican un fenómeno de plasticidad neuronal de latencia larga y duración corta, comparados a los que genera el alcohol o el GABA. Debido a que esta fenomenología es consecuencia de la administración y retiro de un agonista selectivo del receptor $GABA_A$, los siguientes experimentos fueron orientados a

identificar los cambios en este sistema de neurotransmisión por el SAD. Para tal efecto, los siguientes experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro provenientes de animales en abstinencia al Dz. De esta manera, el abordaje de estudio fue reducido a la valoración de la actividad sináptica GABAérgica asociada a condiciones permisibles para cuantificar la sensibilidad farmacológica de esta neurotransmisión.

VII. 3 Hiperexcitabilidad neuronal del área CA1 del hipocampo en rebanadas de cerebro de animales que manifestaron abstinencia a Dz: estudio *ex vivo*.

El hipocampo representa la estructura extracortical con mayor factibilidad de identificar y de valorar cambios en la neurotransmisión GABAérgica por su fácil acceso e interpretación de resultados que a partir de él se obtienen. Esto obedece a dos aspectos básicos: a) el conocimiento de los tipos de componentes neuronales que lo forman y b) su conexión entre ellos (componente sináptico: neurotransmisores y receptores). Por lo tanto, el hipocampo constituye electrofisiológica- y farmacológicamente un excelente circuito neuronal funcional para medir los cambios de inhibición/excitación. Modificaciones en la excitabilidad en el SNC, como resultado de algunos tipos de epilepsias y estados de abstinencia repercuten en la eficacia sináptica del hipocampo (Casasola et al., 2001). Debido a que en la sección 1 de esta tesis registramos el EEG de la corteza cerebral, nuestro siguiente propósito fue estudiar la neurotransmisión GABAérgica del hipocampo *in vitro* como correlato anatómico y electrofisiológico de lo que sucede en el cerebro como resultado la abstinencia a Dz.

Con el propósito de resolver tres cuestionamientos básicos: 1) ¿qué le sucede a la excitabilidad neuronal del hipocampo de un animal con SAD?; 2) las modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica ¿son iguales al inicio de la abstinencia que en los estadios tardíos? y 3) ¿qué sensibilidad farmacológica tiene la neurotransmisión GABAérgica durante el SAD?, se realizaron los siguientes experimentos: ratas que manifestaron el SAD fueron sacrificadas para la obtención de su cerebro y prepararlos para rebanadas 24 h después de la evaluación conductual en el LEC (grupo SAD día-2) y otro grupo de animales fueron preparados sus cerebros para registro de sus rebanadas el día 12 después

del inicio del SAD (SAD día-12); ambos grupos fueron comparados con sus respectivos animales control.

Las rebanadas de cerebro fueron registradas en el *stratum-radiatum* del área CA1 del hipocampo con un protocolo de estimulación estándar en las colaterales de Shaffer (frecuencia 0.01 Hz e intensidad a 50-60% de la respuesta máxima). Este patrón de estimulación evocó los fEPSP, los cuales fueron estables en su morfología y amplitud en un periodo de 3 h de registro en rebanadas control (Fig. 16, círculos negros; n=18).

El registro de la evolución temporal de los fEPSP de las rebanadas de hipocampo provenientes de los animales que manifestaron SAD con 2 días de evolución (SAD-2), mostraron un incremento gradual de la amplitud de la respuesta sináptica. El porcentaje de cambio en la amplitud del fEPSP (promedios de la amplitud normalizado a 100% en los primeros 15 min de inicio del registro) tuvo un incremento rápido y estadísticamente significativo comparado con el grupo control, en los primeros 60 minutos de registro ($230 \pm 18\%$; Fig. 16; triángulos blancos; n=11; $p \leq 0.0001$), tiempo a partir del cual este incremento de amplitud fue estable durante las 2 horas siguientes ($232 \pm 23\%$).

Las rebanadas de hipocampo obtenidas de cerebros de animales con SAD en estadio tardío de la abstinencia (día 12; SAD d-12), también manifestaron incrementos en la amplitud del fEPSP, pero de menor magnitud comparados con el grupo SAD d-2. El registro de la evolución temporal del cambio en la amplitud de los fEPSP en este grupo, mostro valores significativamente mayores a los comparados a los del grupo control a los 60 minutos de inicio del registro ($139 \pm 9\%$; Fig. 16; cuadros blancos; n= 8; $p \leq 0.003$); asimismo, este incremento de la excitabilidad neuronal es estable y perdura por más de 3 horas de registro (180 min; $144 \pm 6\%$; $p \leq 0.0004$).

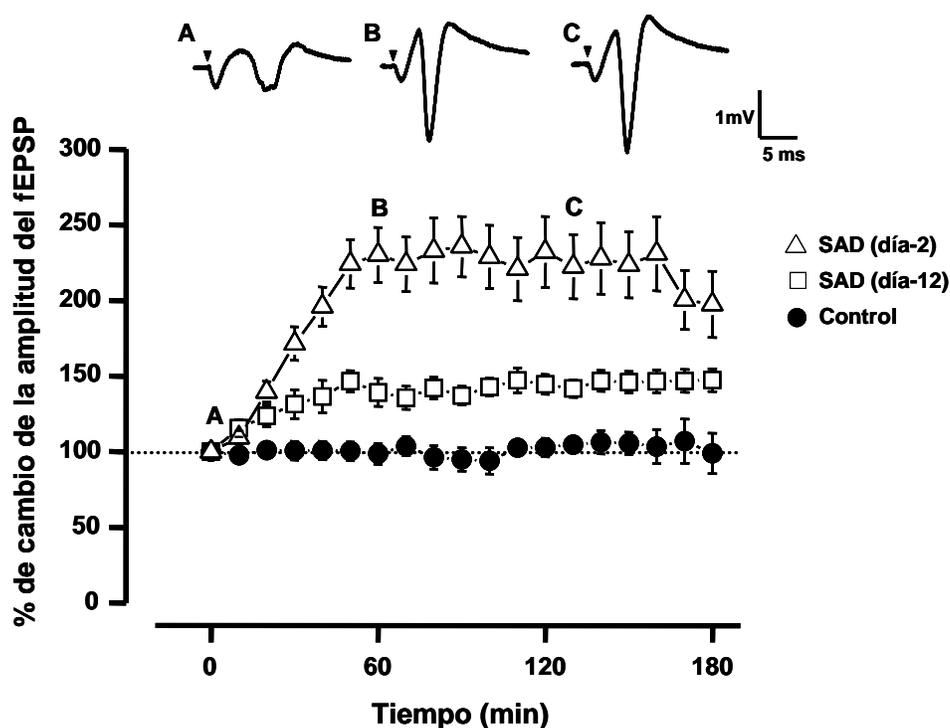
Estos resultados muestran que la hiperexcitabilidad neuronal registrada *in vivo*, es posible cuantificarla como un incremento significativo de la excitabilidad en el hipocampo, el cual puede medirse *in vitro*, aún hasta 12 días después de la última aplicación de la Bz. Este incremento en la excitabilidad neuronal es estable, semejante al que ocasionan otras drogas GABAérgicas en rebanadas de cerebro.

El incremento de la amplitud de los fEPSP del área CA1 por la abstinencia a Dz tuvo una cinética de instalación gradual y un estadio de hiperexcitabilidad persistente, este es un fenómeno de plasticidad neuronal, por cuya característica de inicio y evolución

recuerdan a una potenciación a largo plazo (LTP), a diferencia que en este caso no existe un proceso de estimulación repetida o de alta frecuencia, si no que este evento es resultado de una alteración farmacológica. Debido a esto, fue ineludible estudiar la actividad del sistema GABAérgico y su susceptibilidad farmacológica para resaltar las similitudes y diferencias con respecto a otros fenómenos semejantes ampliamente estudiados en nuestro laboratorio que tienen en común las modificaciones de la neurotransmisión GABAérgica en condiciones de abstinencia.

Figura 16

**HIPEREXCITABILIDAD NEURONAL DEL ÁREA CA1 EN REBANADAS DE HIPOCAMPO
PROVENIENTES DE ANIMALES QUE MANIFESTARON ABSTINENCIA A Dz.**



Hiperexcitabilidad del área CA1 del hipocampo *in vitro* inducida por un abstinencia a Dz *in vivo*. La administración /retiro de Dz por 10 días, provoca un incremento de la actividad sináptica en el hipocampo: el incremento significativo de la amplitud de los fEPSP (triángulos blancos: grupo de animales con SAD d-2; n=11; cuadros blancos: grupo de animales con SAD d-12, n=8). Grupo control (círculos negros; n=18). Los registros representativos superiores muestran la secuencia de los fEPSPs: (A) tiempo 0, (B) 60 min y (C) 2 h de registro.

En el hipocampo, el ingreso de la información excitatoria al área CA1 siempre se asocia a un fuerte control inhibitorio de interneuronas GABAérgicas que impiden: a) la aparición de descargas epilépticas, b) la activación de circuitos reverberantes y c) el reclutamiento asincrónico de poblaciones neuronales (Traub y Jefferys, 1994). Por lo

anterior, la actividad GABAérgica resulta imprescindible en el control de la excitabilidad de esta estructura del cerebro. Esta propiedad electrofisiológica de excitabilidad/inhibición del hipocampo es identificable experimentalmente mediante el protocolo de estimulación por pulsos pareados.

VII. 4 Modificaciones del protocolo de pulsos pareados en condiciones de hiperexcitabilidad inducidas por Dz.

Normalmente, la estimulación en las colaterales de Shaffer que inducen la aparición de dos fEPSPs en el área CA1, separadas por un periodo corto (ms) entre ellos, genera una marcada disminución en la amplitud del segundo fEPSP comparada con el primer fEPSP, es decir, en condiciones control, la relación aritmética de las amplitud del fEPSP2 con respecto al fEPSP1 ($fEPSP\ 2 / fEPSP\ 1$) es menor a 1 en intervalos inter-estímulos (IIE) entre 10 y 60 ms (García-Ugalde et al.,1992; Casasola et al., 2004); esta relación matemática se va perdiendo proporcionalmente cuando el IIE entre ambas respuestas se va haciendo más grande (círculos negros de la fig. 17), estableciendo con ello una regla simple: a menor distancia entre los fEPSP existe una mayor inhibición, cuando el valor de esta relación es igual a 1, entonces ya no existe inhibición recurrente.

De esta manera, en los experimentos utilizando el protocolo de pulsos pareados en condiciones control (n= 37) la relación de pulsos pareados ($fEPSP1 / fEPSP2$) a IIE de 10 ms fue de 0.72 ± 0.02 (Fig. 17A); un incremento del IIE a 30 ms identificó una cociente de 0.91 ± 0.16 (Fig. 17B) y a IIE de 60 ms fue de 0.98 ± 0.01 (Fig. 17C). La inhibición recurrente que prueba la relación de pulsos pareados se debe al siguiente mecanismo sináptico: en paralelo a la estimulación sináptica excitatoria, se estimula a una interneurona recurrente, cuya actividad es inhibitoria, esta neurona libera GABA; por lo tanto, un periodo corto de estimulación, produce una mayor concentración del neurotransmisor GABA en el espacio sináptico, lo que genera una paradoja fisiológica: una alta frecuencia de estimulación o períodos de estimulación cortos, favorecen la disminución de la excitabilidad. Esta actividad de la interneurona en el hipocampo representa un sistema de protección a las neuronas piramidales impidiéndoles despolarizaciones por largos periodos.

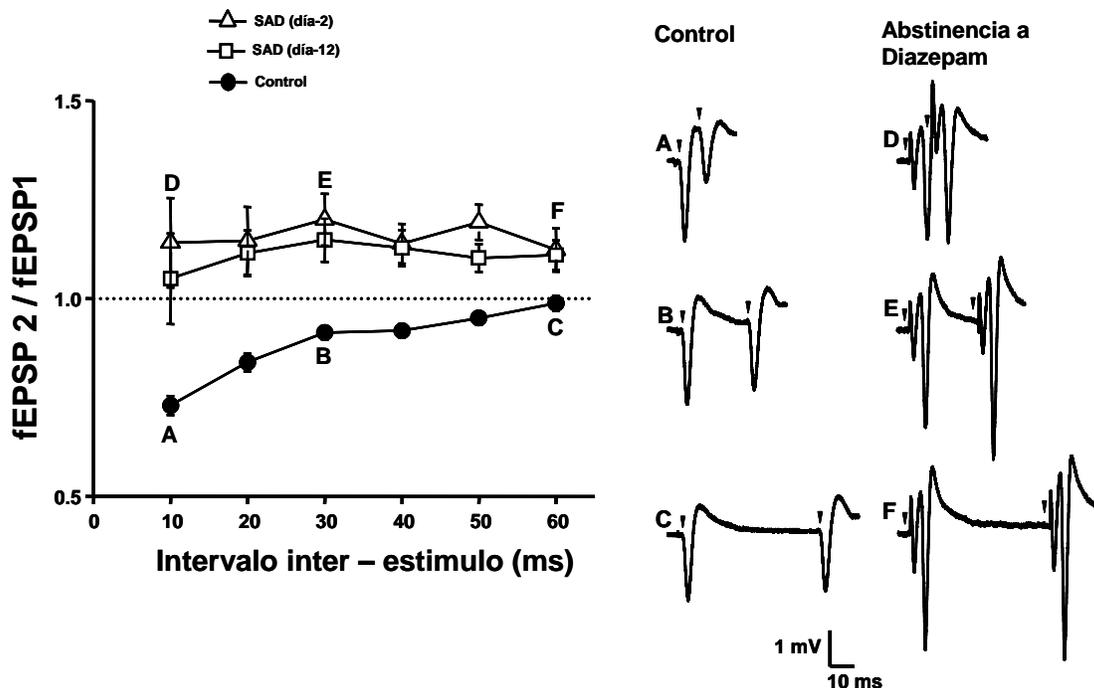
La pérdida de la inhibición recurrente es un correlato común de las epilepsias y/o en condiciones experimentales en las que el receptor $GABA_A$ es farmacológicamente

bloqueado por antagonista específico del receptor, por ejemplo, la Bic (Creager et al., 1980). Por lo que, si la abstinencia a Dz generó cambios en la neurotransmisión GABAérgica, el protocolo de pulsos pareados es una estrategia electrofisiológica cuantitativa para evidenciarlos.

En las condiciones de incremento de la excitabilidad por abstinencia a Dz previamente descritas y registradas en la fig. 16: día 2 (d-2) y día 12 (d-12), el protocolo de pulsos pareados, exhibió la pérdida de la inhibición recurrente. La hiperexcitabilidad por abstinencia a Dz, generó un incremento significativo de la amplitud del segundo fEPSP 2 a IIE cortos, es decir, apareció una nueva condición de excitabilidad en la que se aprecia como característica fundamental la facilitación por pulsos pareados (Fig. 17 D-F; cuadros blancos, d-2 y triángulos blancos, d-12). Constatando con esto, la reducción de la neurotransmisión GABAérgica en la abstinencia a Dz.

Figura 17

PÉRDIDA DE LA INHIBICIÓN RECURRENTE DEL ÁREA CA1 DEL HIPOCAMPO POR LA ABSTINENCIA A DZ



A la derecha, se muestran fEPSPs de un experimento característico en el que la abstinencia a Dz induce la aparición de facilitación sináptica (D-F), la cual contrasta con la inhibición recurrente control (A-C). En el panel izquierdo, se muestra el gráfico matemático del protocolo de estimulación por pulsos pareados a intervalos de 10 -60 ms, el cociente de la amplitud del segundo fEPSP entre la del primer fEPSP brinda una relación de inhibición (condiciones control: círculos negros, n=37) o facilitación (condiciones de abstinencia a Dz, día-2: triángulos blancos, n=5; día-12 cuadros blancos: n= 18).

No obstante que la hiperexcitabilidad inducida por abstinencia a Dz en el d-2 y el d-12 son proporcionalmente distintas en la evolución temporal (fig. 16), la facilitación por pulsos pareados es semejante en ambos días sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p \leq 0.3$). Así por ejemplo, el IIE a 10 ms en SAD d-2 (triángulos fig. 17D) cuantificamos un valor de 1.14 ± 0.11 en tanto que el d-12 fue de 1.05 ± 0.11 (cuadros blancos, fig. 17), ambos valores son significativamente distintos al control ($p \leq 0.005$). El análisis de la facilitación sináptica evidenció que a IIE de 30 ms en el d-2 fue de 1.19 ± 0.06 (fig. 17E), en tanto que al d-12 se constató valores de 1.14 ± 0.05 ; a IIE de 60 ms, en el d-2 se obtuvieron valores de 1.12 ± 0.05 (fig. 17F) y para el d-12 de 1.10 ± 0.03 .

Los datos anteriores muestran una marcada disminución de la actividad GABAérgica por la abstinencia a Dz, este fenómeno perdura en el transcurso de varios días, describiendo con ello, una plasticidad sináptica que subsiste aún cuando el incremento de la excitabilidad neuronal ya ha disminuido (día 12).

VII. 5 Modificaciones de la relación de intensidad (estimulación)/ voltaje (amplitud de la respuesta) en condiciones de hiperexcitabilidad inducidas por Dz.

En condiciones control, la amplitud de una respuesta sináptica (fEPSP) depende de la intensidad, frecuencia y duración de la estimulación, si estas dos últimas son constantes, entonces la amplitud del fEPSP depende de la intensidad del estímulo que desencadena la actividad sináptica. Esta relación estímulo-respuesta (E/R), debe ser la misma si se repite 60, 120 y 180 minutos después del primer registro. En otras condiciones, un incremento en la relación E/R (LTP, epilepsia, hiperexcitabilidad farmacológica, etc.) se deberá entonces a cambios en la neurotransmisión en sí (cantidad de neurotransmisor, cambios en los receptores, etc.) y no se presentará como consecuencia de un artefacto de estimulación.

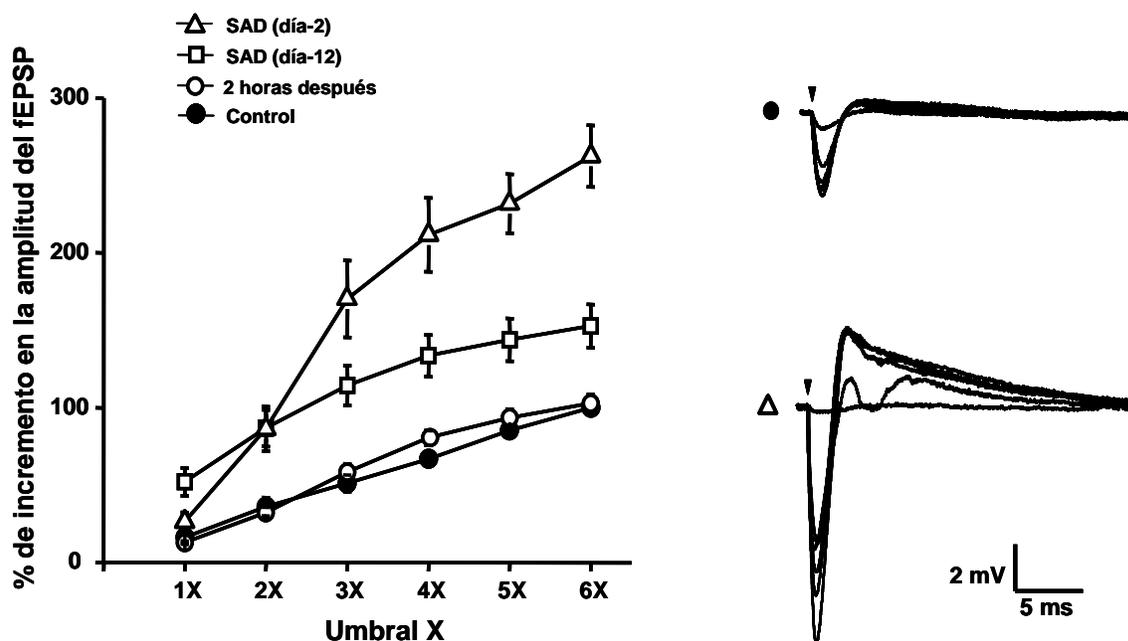
Tal y como se muestra en la fig. 18, una rebanada control no genera modificaciones en esta relación E/R en el tiempo. Los fEPSPs fueron generados por el mismo rango de intensidad de estimulación (50-60% de la respuesta máxima), semejante duración (0.40-1.0 ms) y frecuencia (0.1-0.2 Hz). Considerando que en condiciones de hiperexcitabilidad por

la abstinencia de Dz, la pérdida de la inhibición recurrente indica un déficit del control GABAérgico, nuestros siguientes experimentos fueron orientados a demostrar que en estas rebanadas de hipocampo la relación E/R debe ser mayor en la evolución temporal del experimento.

En condiciones control, la curva E/R guarda proporcionalidad en el incremento de la amplitud del fEPSP (Fig. 18, círculos negros) y es semejante 2 horas después de haber registrado la primera. Para obtener este experimento, decidimos normalizar la intensidad del estímulo a un valor inicial de umbral de inducción del fEPSP, por lo que la cantidad mínima para generar la respuesta sináptica se definió como valor umbral ó 1x.

Figura 18

MODIFICACIÓN DE LA RELACIÓN AMPLITUD DEL fEPSP/ INTENSIDAD DE LA ESTIMULACIÓN, EN CONDICIONES DE ABSTINENCIA A DZ.



El incremento en la amplitud del fEPSP control (círculos negros, n=10) guarda una proporción lineal del valor umbral (valores normalizados a la intensidad mínima para generar un fEPSP) hasta 6 veces este valor-umbral, esta relación es semejante 120 min., después del primer registro (círculos blancos, n=17). En contraste, rebanadas de animales con abstinencia a Dz en día-2 (triángulos, n=18) o día-12 (cuadros blancos, n=18) muestran un corrimiento en la curva a la izquierda, lo que implica un incremento significativo en la excitabilidad celular. En el panel derecho, se muestran los registros control –porción superior- y en condiciones de abstinencia a Dz d-2.

En rebanadas con incremento de la excitabilidad neuronal por la abstinencia a Dz (tanto en d-2 como en d-12) la curva E/R se corre a la izquierda (fig. 18). Este corrimiento

de la relación E/R aduce que existe un mayor número de neuronas sincronizadas en su disparo y despolarización.

En resumen, los resultados previos indican: 1) la hiperexcitabilidad neuronal por la abstinencia a Dz genera una disminución de la inhibición recurrente, 2) aumenta la probabilidad de reclutamiento de neuronas en proceso de despolarización y 3) esta hiperexcitabilidad se mantiene constante y no es consecuencia de la frecuencia e intensidad de la estimulación.

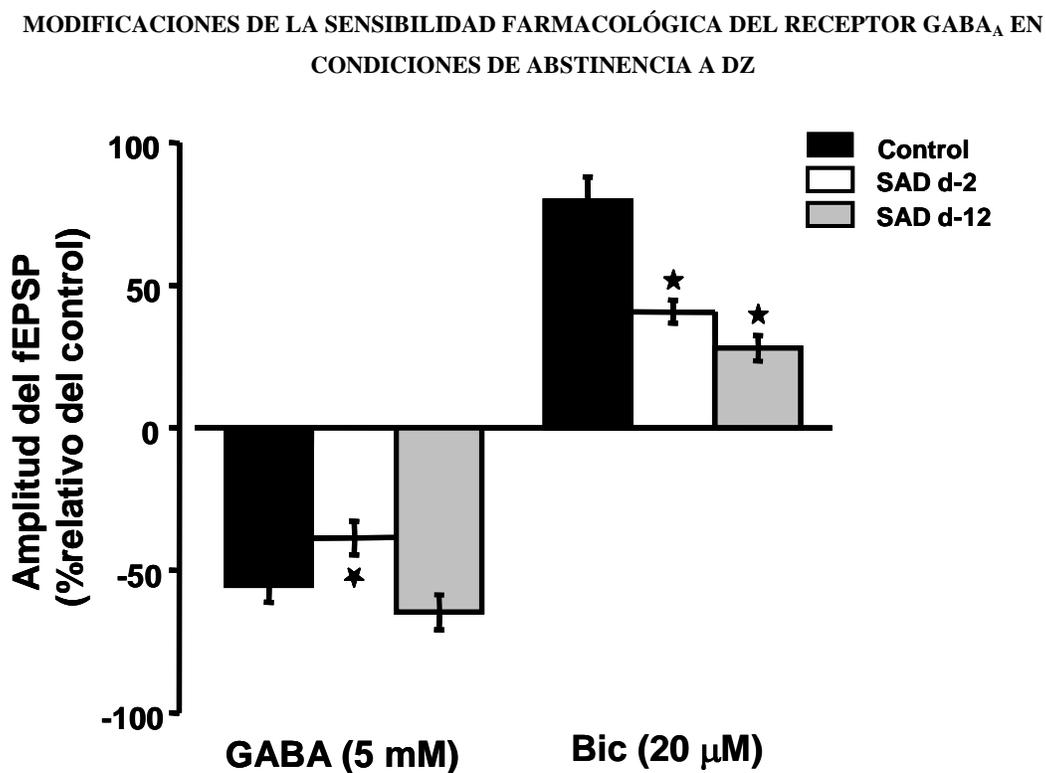
VII. 6 Estudio electro-farmacológico de la neurotransmisión GABAérgica en el cerebro de animales que manifestaron abstinencia a Dz: estudio *ex vivo*.

Para proponer que el mecanismo por el cual se incrementa la excitabilidad neuronal del hipocampo *in vitro* por la abstinencia a Dz es un evento sináptico GABAérgico, la siguiente serie de experimentos fue encaminada a cuantificar las modificaciones en la sensibilidad farmacológica del receptor GABA_A en las nuevas condiciones de excitabilidad generadas por la abstinencia a Dz.

En condiciones control, la exposición del agonista-endógeno del receptor (GABA, 5 mM; n=12) produjo una reducción significativa en la amplitud del fEPSP (55 ± 6 %; $p \leq 0.07$). En contraste, la superfusión del antagonista del receptor (Bic, 20 μ M; n=5) el cual indujo un incremento significativo de la respuesta, 79 ± 8 %, $p \leq 0.0006$; barras negras, Fig. 19. Sin embargo, en las rebanadas de hipocampo provenientes de animales en SAD d-2, el efecto inhibitor del GABA fue significativamente menor que el control (38 ± 5 %; n=20; $p \leq 0.02$); asimismo, en otro grupo de rebanadas con las mismas condiciones de excitabilidad (SAD d-2), el efecto de la Bic fue discretamente menor que en las condiciones control (40 ± 4 %; n=19; $p \leq 0.03$; barras blancas, Fig. 19). Estos datos indican que la abstinencia a Dz disminuye la sensibilidad farmacológica del receptor GABA_A para ambos efectores: agonista y antagonista (tolerancia cruzada). Este evento puede ser la expresión de una disminución en el número de receptores (*down-regulation*) o modificaciones en las subunidades que componen al receptor, como lo que se ha publicado previamente para otro tipo de abstinencias.

Una secuencia experimental semejante a la anterior, pero en rebanadas de cerebro provenientes de ratas con SAD d-12, permitió identificar una recuperación del efecto inhibitor del GABA sobre la amplitud del fEPSP del hipocampo ($64\pm 6\%$; $n=6$; $p\leq 0.2$). En contraste, la actividad farmacológica de la Bic fue menor a la cuantificada en los controles e incluso significativamente menor a la identificada en animales con el SAD d-2 ($27\pm 4\%$; $n=15$; $p\leq 0.03$; barras grises Fig. 19). Esta serie de resultados infieren una recuperación parcial de la sensibilidad farmacológica GABAérgica a lo largo de la abstinencia a Dz, permitiendo hacer hincapié en la evolución temporal de la abstinencia: una recuperación de la actividad al GABA coincide con una menor excitabilidad neuronal en la corteza cerebral (EEG) y en el hipocampo (fEPSP).

Figura 19



La inhibición en la amplitud del fEPSP del área CA1 del hipocampo inducida por GABA (control, barra negra, panel izquierdo) es significativamente menor cuando el animal se encuentra en SAD d-2 ($p\leq 0.07$; barra blanca), asimismo, en estas condiciones de excitabilidad existe una disminución significativa del efecto de Bic ($p\leq 0.0006$, barra blanca, panel derecho). La evolución del SAD d-12 permitió identificar una recuperación farmacológica del hipocampo al GABA (barra en gris, panel izquierdo), sin embargo, el efecto de la Bic continuo siendo significativamente menor al control e incluso al SAD d-2 ($p\leq 0.03$ y $p\leq 0.0002$, respectivamente).

VII. 7 Modificación de la susceptibilidad de inducción de crisis epilépticas por PTZ en animales con abstinencia a Dz.

Los resultados de la presente tesis, muestran que la interrupción del tratamiento de 10 días con Dz fue suficiente para inducir un incremento en la actividad cortical del animal: aparición de espigas-ondas cuantificadas en el EEG. Este incremento en la actividad cortical tuvo una relación directa con la generación de la ansiedad valorada por el LEC. Asimismo, los registros *in vitro* de los cerebros de estos animales comprobó que el área CA1 del hipocampo existe también un incremento de la excitabilidad neuronal valorado por la estimulación sináptica y la obtención de los fEPSPs. Esta preparación nos permitió identificar que la amplitud de la respuesta sináptica crece gradualmente. Este modelo de plasticidad neuronal *in vitro* es posible por modificaciones en la actividad de la neurotransmisión GABAérgica, ya que en las rebanadas de cerebro comprobamos que existe una facilitación sináptica (prueba de un cambio en la actividad de la interneurona recurrente) y porque farmacológicamente existe un cambio en la sensibilidad al agonista endógeno y el antagonista bicuculina del receptor.

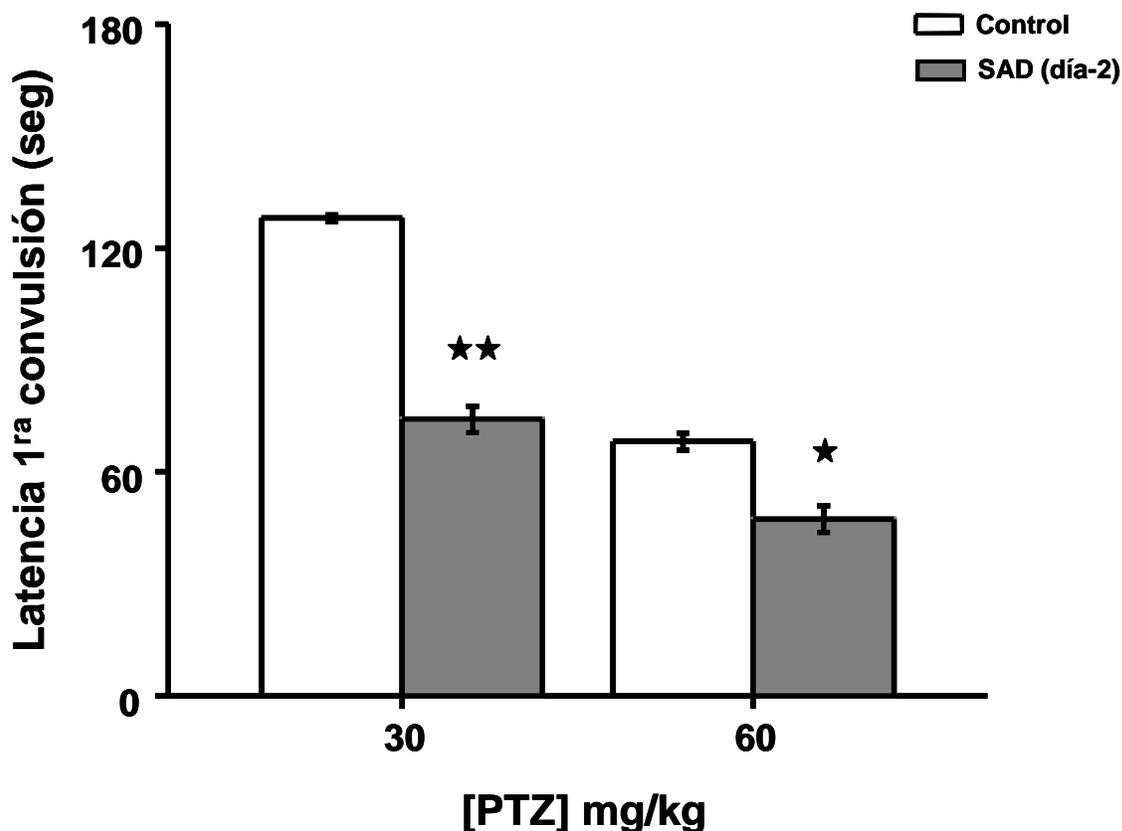
En virtud, de que el estudio de estos cambios en la neurotransmisión GABAérgica se realizó en condiciones *ex vivo*, decidimos comprobar que en el animal integro también se puede tener un correlato de los cambios en esta neurotransmisión inhibitoria del cerebro. Por ello, un diseño simple de estudio de los cambios en el umbral de inducción de crisis epilépticas a través de la administración del antagonista GABA_A, el PTZ, permitió identificar que los animales en abstinencia son más vulnerables para desarrollar crisis convulsivas.

En esta serie de experimentos, cuantificamos la aparición de la primera crisis convulsiva después de la administración vía IP de PTZ (30 mg/Kg) a animales control (n=5), esta dosis de PTZ indujo crisis tónico-clónicas con una latencia promedio de 128 ± 0.9 segundos (primer barra blanca; Fig. 20). En un segundo grupo de animales, a los cuales se les incremento las dosis de PTZ a 60 mg/Kg (n=6), la latencia de las crisis epilépticas fue de 68 ± 2 seg., es decir, el incremento de la dosis reduce la latencia en un 50% (segunda barra blanca a la derecha de la Fig. 20). De esta manera constatamos que la inducción de crisis convulsivas por PTZ está en función de la concentración del fármaco.

La secuencia de esta última parte del presente estudio consistió en administrar PTZ a animales en el día 2 del SAD. En el primer grupo de animales con SAD d-2, la administración de PTZ (30mg/Kg) indujo una latencia de aparición de la primera crisis convulsiva significativamente menor con respecto a la obtenida por los animales control, (74 ± 3.6 seg; $n=6$; $p \leq 0.0001$; panel de la izquierda, Fig. 20). Otro grupo de animales con SAD d-2, la dosis de PTZ a 60 mg/Kg, ($n=5$) la latencia cuantificada fue de 47 ± 3.6 seg., es decir, la abstinencia a Dz también permite una reducción significativa de la latencia de aparición de las crisis convulsivas ($p \leq 0.04$; columna gris derecha de la fig. 20).

Figura 20

INCREMENTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A INDUCIR CRISIS CONVULSIVAS DURANTE EL SAD



El SAD-durante el día 2, reduce la latencia de aparición de la primera crisis tónico-clónica inducida por PTZ a dos diferentes dosis $**P \leq 0.0001$, $*P \leq 0.04$.

La reducción de la latencia de las crisis convulsiva en el día 2 del SAD fue de un 47% a la dosis de 30 mg/Kg, en tanto que, a la dosis de 60 mg/Kg redujo la latencia en un

31%, en ambos casos, como se mencionó anteriormente, la reducción fue significativa. Esto indica que el incremento de la excitabilidad de cerebro de los animales con abstinencia muestra una mayor susceptibilidad a las crisis epilépticas inducidas por PTZ. Aspecto clínico que coincide con los cambios neuronales y clínicos cuantificados en humanos en condiciones de abstinencia a Bzs o alcohol.

VIII Discusión

VIII.1 El Síndrome de Abstinencia al Diazepam (SAD): descripción.

La presente tesis es un estudio secuencial de tres enfoques complementarios e interdependientes: electrofisiológico, conductual y farmacológico. La línea general de este trabajo fue demostrar la susceptibilidad de inducir cambios en la excitabilidad del cerebro por la interrupción al sistema nervioso de la administración de una benzodiacepina y su impacto en la neurobiología de la neurotransmisión GABAérgica.

La abstinencia a Dz se caracteriza por un incremento significativo en la excitabilidad de la corteza cerebral (EEG) y en las rebanadas de hipocampo (incremento en la amplitud de los fEPSPs del área CA1), ambos eventos están asociados a la aparición de un perfil ansiogénico en el animal y asimismo, todos estos eventos están relacionados a modificaciones en la sensibilidad farmacológica del receptor GABA_A.

El SAD tiene una latencia de 24 h y duración de 7 días. En ese periodo, el SAD es cuantificado al EEG por la presencia de complejos espiga-onda. En el día 2 de su evolución, los animales manifestaron una ansiedad significativa valorada por el laberinto en cruz asociado a una mayor susceptibilidad de generar crisis epilépticas. Al registrar el cerebro de estos animales, en la preparación de rebanadas de cerebro, el área CA1 del hipocampo puso de manifiesto que esta estructura del sistema nervioso también incrementa su excitabilidad, en estas condiciones se identificó que el SAD se asocia a una pérdida de la inhibición recurrente GABAérgica y a cambios en la farmacología del receptor GABA_A.

Este modelo de inducción de una abstinencia basado en la exposición crónica de un agonista GABAérgico, seguido de la interrupción abrupta de la aplicación de la droga, es una analogía heurística de lo que sucede clínicamente con diversas drogas que generan abstinencias en el humano: alcohol, diversas benzodiacepinas, barbitúricos y neuroesteroides (Toone y Fenton, 1977; Mellerio, 1980; Smith et al., 1998; Spies et al., 2003). En este modelo, la hiperexcitabilidad neuronal cuantificada por la abstinencia es la expresión de modificaciones de la neurotransmisión GABAérgica a nivel pre-sináptico como modificaciones en la liberación de GABA y post-sináptico, cambios en la estructura y función del receptor GABA_A (Calixto et al., 2000).

VIII.2 Modificaciones electrofisiológicas en el SAD

La primera fase de esta tesis muestra la evaluación del SAD a nivel EEG. En esta etapa demostramos que el SAD, está constituido inicialmente por una tolerancia farmacológica a la benzodiacepina, identificada a partir del 7^o día de exposición (Fig. 14B-C). Por estudios previos se conoce que aplicar un benzodiacepina en roedores induce inmediatamente diversas conductas estereotipadas: masticación, taquipnea, hipotonía, disminución del movimiento del tren posterior, ocultamiento y fotofobia (Wala et al., 1999). Si bien, identificamos todos estos datos clínicos inmediatos a la aplicación del Dz en la rata, sólo cuantificamos la actividad electrofisiológica de masticación en el EEG. La disminución de la inducción de masticación por el Dz el primer fenómeno farmacológico que sugiere los cambios en la excitabilidad del sistema nervioso (Fig.14C). El sustrato anatómico de este evento se ha sugerido sea por modificaciones en la transmisión GABAérgica de la sustancia negra de los ganglios basales y de la corteza cerebral (Wala et al., 1999).

Si la aplicación de Dz se suspende al día 10, aparece, 24h después de la última aplicación, una actividad de complejos espigas-onda con mayor frecuencia en las regiones parietales, esta es una actividad epileptiforme de gran amplitud y alta frecuencia (250 μ V/ 1 Hz; Fig. 14D-E). A partir de ese tiempo las descargas disminuyeron en frecuencia y después en amplitud hasta desaparecer al día 5 del SAD. Investigaciones previas muestran que la latencia y la duración de las abstinencias dependen de la dosis del agonista y del tiempo de exposición del mismo (Brailowsky et al., 1990). Por ejemplo, el GABA, el agonista endógeno, permite una abstinencia en la cual, si la concentración de instilación es de 5 mM y la duración del tratamiento es de 14 días, la latencia de aparición de la primera descarga es de 10 min., y la duración del SAG es de 20 h. Reducir el tiempo de exposición a 1 semana, genera una abstinencia con latencia de 20 min., y duración de 40 h. Es decir, reducir el tiempo de exposición del GABA 5 mM, al cerebro incrementa la latencia y la duración del síndrome. De tal forma, que la exposición de 2h, genera latencias de 90 min., y la duración del síndrome es de 7 días (Fig. 7 de esta tesis. Calixto et al., 2000). La exposición de un agonista específico del receptor GABA_A, como la isoguvacina (10 μ M; por 2 h) genera una abstinencia cuya latencia es de 213 min., y duración de 4 días (Brailowsky et al., 1991; Montiel et al., 2000). Incrementar la concentración de GABA o

isoguvacina incrementan sus respectivos síndromes de abstinencia: reducción de la latencia e incremento de la duración. En referencia a Dz, Korkmas y Wahlström (1999), demostraron esta relación dosis-duración de la abstinencia para el Dz y lorazepam. Los resultados de la presente tesis concuerdan con estos autores: latencia de 1 día y duración de 5 días.

Otro factor involucrado en el proceso de modificaciones farmacológicas inducido por el Dz es que también tiene una farmacocinética inductora hepática: induce la síntesis *de novo* del citocromo P-450, el cual facilita la tasa de biotransformación, cuya consecuencia a mediano plazo es una disminución y transformación del Dz, es decir, las aplicaciones consecutivas de Dz disminuyen la biodisponibilidad del fármaco (Goodman, 1996). Una de las grandes diferencias entre los síndromes de abstinencia generados por el GABA, la isoguvacina o los neuroesteroides, es que, aquellos que pasan a través del hígado (alcohol, benzodiazepinas y barbitúricos) generan síndromes de abstinencia con latencias mayores. Esta es una de las explicaciones por las cuales, el SAD tiene diferencias sustanciales con el SAG comparándolo por ejemplo con su latencia.

El tiempo de exposición de la benzodiazepina utilizado en esta tesis (10 días) se basó en estudios previos con distintas drogas GABAérgicas (Bagetta et al., 1987; Löscher et al., 1996).

El cálculo de la dosis (7 mg/Kg/24 h) obedece a dos puntos: basada en trabajos previos (Hawkins et al., 1988; Karin et al., 1993) y con respecto a la necesidad de inducir cambios específicos en la neurotransmisión GABAérgica procurando disminuir las modificaciones en otras neurotransmisiones cerebrales como la glutamatérgica (Korkmaz y Wahlström, 1999).

VIII.3 Modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica en el SAD: el estudio *in vitro* tiene implicaciones *in vivo*.

Cerebros provenientes de animales con SAD, fueron preparados para obtener rebanadas de hipocampo, las cuales son estructural y fisiológicamente funcionales para estudiar la neurotransmisión GABAérgica. El hipocampo nos brindó información sináptica para la que el EEG está limitada. En la rebanada de hipocampo podemos identificar las estructuras anatómicas y tener un control estricto de las fibras que se estimulan y de las

neuronas que se registran. La variable de estudio en esta secuencia de experimentos fue identificar la actividad del receptor GABA_A en condiciones tempranas (día 2) y tardías (día 12) del SAD.

El incremento en la amplitud de la actividad sináptica del área CA1 del hipocampo (Fig. 16) indica que un mayor número de neuronas está siendo sincronizadas en su disparo de potenciales de acción en el tiempo. Este dato es semejante a lo que genera la abstinencia al GABA *in vitro* (García-Ugalde et al., 1994; Calixto et al., 2000; Casasola et al., 2001) o al LTP (Calixto et al., 2003). Es decir, estas rebanadas generan un estado de plasticidad neuronal tendiente a un incremento en su actividad. Como esperábamos, el incremento de la excitabilidad en el área CA1 del hipocampo es mayor si el tejido cerebral proviene de animales con estadios tempranos de abstinencia. El SAD d-2 muestra más hiperexcitabilidad que un SAD d-12. Datos semejantes a los que se determinan en un SAG (Brailowsky et al., 1990).

Existen dos posibilidades para explicar este nuevo estado de incremento de la fuerza sináptica. La primera refiere una modulación positiva de la neurotransmisión glutamatérgica. Evidencias recientes señalan que las abstinencias a benzodiazepinas tiene en su inicio una *up-regulation* de receptores AMPA y canales de Ca²⁺ tipo L asociada a una *down-regulation* de receptores NMDA (Allison et al., 2005). Este incremento en la entrada de Ca²⁺ en las neuronas facilita la liberación de neurotransmisores y asimismo, incrementa la actividad del componente post-sináptico. Establecer que la modulación positiva de la neurotransmisión glutamatérgica sea el único mecanismo de génesis limita la discusión de otros mecanismos o los cambios en otras neurotransmisiones.

La segunda alternativa que explica los mecanismos de inicio de las abstinencias es una disminución de la actividad GABAérgica. Datos previos de nuestra línea de investigación señalan que el receptor GABA_A modifica su estructura y función en condiciones de hiperexcitabilidad por abstinencias. La exposición de neuroesteroides GABAérgicos, como la aloP disminuye la expresión de la subunidad $\alpha 1$ del receptor GABA_A e incrementa la expresión de la subunidad $\alpha 4$ (Smith et al., 1998). La exposición crónica de alcohol incrementa la expresión de la subunidad $\alpha 4$ también (Buck et al., 1991; Mhatre y Ticku, 1992; Follesa et al., 2006). Algunas benzodiazepinas como el clonazepam y el Dz mismo, modifican la expresión a corto plazo de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ y δ

(Impagnatiello et al., 1996; Pesold et al., 1997; Follesa et al., 2003). Es decir, un común denominador de las abstinencias es la modificación del receptor en su estructura lo cual genera una disminución en su eficacia farmacológica. La abstinencia de GABA *in vitro* en la corteza cerebral (Calixto et al., 2000) y en el hipocampo (Casasola et al., 2001) muestran otro común denominador: existe una marcada disminución en el número de receptores GABA_A en los estadios iniciales de la abstinencia (2 h). Finalmente, la actividad neuroquímica en la abstinencia al GABA cambia en forma significativa, durante el SAD, la síntesis de GABA esta disminuida (Salazar et al., 1988) y la liberación de GABA esta abolida (Calixto et al., 2000). Un análisis reduccionista de un posible mecanismo generador secuencial de las abstinencias a través de la neurotransmisión GABAérgica es el siguiente: una disminución en el número de receptores GABA_A asociada a una modificación estructural de los mismos que a su vez va generando una menor síntesis y liberación de GABA.

En función a esta hipótesis, nuestros experimentos fueron dirigidos a identificar la sensibilidad farmacológica del receptor. En las rebanadas de hipocampo de cerebros de animales a los que se les cuantifico un SAD, identificamos una disminución del efecto inhibitor del GABA y a una reducción del efecto del antagonista específico del receptor, la Bic.

La neurotransmisión GABAérgica esta disminuida en el cerebro de animales con SAD. En condiciones de abstinencia el protocolo de pulsos pareados permite identificar una pérdida de la inhibición recurrente. Semejante a lo que sucede en corteza cerebral y en el hipocampo durante la abstinencia a GABA y al alcohol, la inhibición recurrente es sustituida por un proceso de facilitación sináptica (Fig. 17. Calixto et al., 2000; Casasola., 2001; Myrick y Antón, 1998). Asociada a este evento, el agonista y el antagonista selectivo del receptor GABA_A, el GABA y la Bic respectivamente, están reducidos significativamente en su efecto farmacológico alrededor de un 40% en los cerebros de animales con un SAD en el día 2 (Fig.19). Estos datos involucran un proceso de tolerancia cruzada, característica de los síndromes de abstinencia (Robinson et al., 1981). Constatamos que la sensibilidad a GABA puede recuperarse parcialmente al día 12 de abstinencia.

La lectura en conjunto de estos datos indican que la exposición de Dz durante 10 días, son capaces de generar modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica semejantes a los que ocasiona los neuroesteroides, el GABA y el alcohol. (Brailowsky, 1991; Smith et al., 1998; Roberto et al., 2006). Es factible que en el SAD se induzca una reducción en el número de receptores GABA_A, (*down-regulation*) aspecto asociado a una modificación en estructural del mismo receptor (modificación de expresión de subunidades), ambos eventos asociados a una disminución de la liberación de GABA, explican la disminución de la actividad farmacológica del GABA y Bic (Fig. 19), el incremento de sincronía en disparo de los grupos de neuronas en la corteza cerebral (Fig. 14) y en el hipocampo (Fig. 16), además de que en este último explica: (a) el corrimiento de la curva intensidad-respuesta a la izquierda (Fig. 18), (b) el incremento de la amplitud del fEPSP (Fig. 16) asociado a (c) la facilitación sináptica cuantificada en el protocolo de pulsos pareados (Fig.17).

Evidencias previas de nuestra línea de investigación indican que la exposición de un antagonista de los receptores NMDA durante la instilación de GABA, no modifica la expresión del SAG, la latencia y duración de la abstinencia a GABA son semejantes a los animales que recibieron GABA únicamente (Calixto et al., 1995). Es posible que después de haberse iniciados las modificaciones GABAérgicas enunciadas en el párrafo anterior, se generen los cambios en la neurotransmisión glutamatérgica, como la *up-regulation* de receptores AMPA y *down regulation* de receptores NMDA, lo cual, puede incrementar aun más la hiperexcitabilidad de la abstinencia. Con esto, no descartamos que la neurotransmisión glutamatérgica esta implícita en los mecanismos que expliquen la hiperexcitabilidad, sin embargo, proponemos que esta neurotransmisión se involucre en los mecanismos de mantenimiento y no de génesis del incremento de la excitabilidad neuronal característica de la abstinencia. Estudios futuros de nuestro laboratorio estarán investigando esta hipótesis.

VIII.4 Dos perfiles: el ansiogénico y el epileptogénico en el SAD

Las manifestaciones clínicas del SAD fueron estudiadas por ensayos complementarios, la hiperexcitabilidad neuronal esta asociada a un proceso de ansiedad y esta a su vez tiene una relación con el incremento para desarrollar crisis convulsivas.

La aplicación de la prueba conductual en el LEC 24 h después de haberse iniciado la actividad epileptogénica es un modelo ampliamente aceptado en distintos modelos de abstinencia y de estudios de ansiedad (Emmett-Oglesby et al., 1983; Rodgers y Dalvi, 1997). Una razón fundamental para la interpretación adecuada de los datos, es que el primer día de abstinencia, el animal puede estar aun inmovilizado por el efecto de la droga en estudio, lo cual puede alterar la interpretación de si en realidad es un proceso de ansiedad o es un efecto de la droga. Además, la prueba no puede realizarse más de una ocasión, ya que el animal puede habituarse a la prueba, lo cual puede generar una interpretación errónea de los datos (González et al., 1984).

El estudio conductual del LEC permitió identificar que la ansiedad es un componente clínico del SAD (Fig.15). La ansiedad es un síntoma que acompaña a diversos trastornos psiquiátricos o psicopatológicos, que son generados por estímulos internos o externos. Clínicamente, el fármaco de primera elección para el tratamiento de la ansiedad es el Dz. Esta tesis esta a favor de la discusión en la que el medicamento más utilizado en tratamiento de la ansiedad, también la puede generarla (Izo et al., 2000; De Ross et al., 2008).

Estudios recientes muestran que el tratamiento de Dz durante 28 días a dosis de 5 mg/Kg/día vía IP desarrolla una abstinencia semejante a la genera 15 mg/Kg pero por vía SC. En ambos casos, la propuesta de los mecanismos relacionados a modificaciones en la excitabilidad celular es directamente por modificaciones del receptor glutamatérgico AMPA, las subunidades de este receptor se incrementan en el hipocampo y en el tálamo en tanto que en la amígdala y la corteza cerebral se manifiesta una disminución del receptor (Allison y Pratt, 2006). La neurotransmisión GABAérgica también se modifica en los procesos de ansiedad secundaria a la abstinencia a Dz. El incremento en la expresión de las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del receptor GABA_A es suficiente para desarrollar ansiedad en ratones (Navarro et al., 2006). Las mismas subunidades relacionadas en la génesis de las abstinencias a diferentes drogas GABAérgicas. Es decir, la *down regulation* de los receptores GABA_A y NMDA asociada a la *up-regulation* de los receptores AMPA, son también el origen de la ansiedad en el animal con abstinencia. Con esto, queda de manifiesto que modificaciones en el componente pre-sináptico (liberación y síntesis de

GABA) y post-sináptico (receptores GABA_A, NMDA y AMPA) son el componente de muchas abstinencias.

En esta tesis se ha identificado un modelo de génesis de la abstinencia a Dz más eficaz desde el punto de vista farmacológico, ya que reducir la dosis de la Bz al 50% (de 15 a 7 mg/kg) y el tiempo de tratamiento (de 28 a 10 días) al 60% es posible generar abstinencia asociada a descargas epileptiformes del área parietal del cerebro y un nivel significativo de ansiedad.

Diversos estudios farmacológicos, neuroquímicos y conductuales indican la disminución en la transmisión sináptica GABAérgica cerebral o el incremento en la transmisión sináptica glutamatérgica desencadenan convulsiones acompañadas de actividad epileptiforme. Por consiguiente, en animales de laboratorio se puede inducir epilepsia experimental al antagonizar a los receptores GABA_A con fármacos tales como el PTZ, o al incrementar la liberación de glutamato con fármacos como la 4-aminopiridina (4-AP). El último propósito de esta tesis fue explorar si el SAD favorece a la crisis epilépticas por PTZ, aduciendo que un estado de hiperexcitabilidad previo incrementa esta susceptibilidad a las crisis mioclónicas.

La curva dosis-efecto de PTZ se desplaza a la izquierda en el SAD, esto indica un incremento en la eficacia del PTZ para generar crisis mioclónicas generalizadas, es decir, el estado de abstinencia potencia el efecto epileptógeno. Semejante a lo que induce la abstinencia a etanol (Beckley et al., 2008), a neuroesteroides (Moran y Smith, 1998; Reddy et al., 2001), a clonazepam (Gupta et al., 2000) y a lo publicado por Ward y Stephens, 1998: la exposición de Dz es suficiente para cambiar la sensibilidad a las crisis convulsivas por PTZ y generar un incremento a la sensibilidad de estímulos ansiogénicos (Fig.20; Ward y Stephens, 1998).

No obstante a que durante el estudio de las crisis epilépticas por PTZ también identificamos una disminución en la latencia de muerte del animal, estos datos han sido reportados por diversos estudios previos (Ward y Stephens, 1998) por esta razón, únicamente la latencia de la primera crisis mioclónica generalizada fue cuantificada.

Las crisis mioclónicas generalizadas inducidas por PTZ son la expresión de un bloqueo de la neurotransmisión GABAérgica en corteza cerebral, hipocampo, amígdala y tallo cerebral. En este caso, un estado de abstinencia en el que se tiene una reducción de la

actividad del receptor GABA_A la sensibilidad a PTZ esta conservada y es potenciado su efecto epileptogénico. En contraste, en rebanadas de hipocampo, otro bloqueador del mismo receptor: la Bic, se cuantificó una disminución de su efecto comparado con el grupo control. Es decir, la sensibilidad farmacológica a diversos antagonistas del receptor puede ser diferencial. Es necesario tomar en cuenta, que la sensibilidad a Bic fue cuantificada en el hipocampo y en rebanadas, en tanto que el efecto de PTZ fue valorado en el animal integro, en el que diversas estructuras del sistema nervioso están presentes e interconectadas y seguramente esta comunicación sináptica traduce el efecto sumatorio crisis convulsivas.

Los datos de esta tesis en relación del efecto del PTZ y el umbral de crisis convulsivas están acordes con los reportados por Banutova y cols (1978). Estos autores mencionan por primera vez un hallazgo importante: durante las crisis convulsivas y la ansiedad los cambios a nivel sináptico por la abstinencia a Dz, dependen en primera instancia por cambios GABAérgicos, pero estos están asociados a una marcada disminución en los niveles de serotonina y adrenalina (Bantutova et al., 1978).

IX Conclusiones

- El retiro abrupto de la exposición crónica de Dz es capaz de generar un síndrome de abstinencia: el cual se manifiesta por el incremento en la excitabilidad neuronal al EEG (*in vivo*) y en rebanadas de cerebro (*in vitro*).
- A nivel EEG, el SAD se cuantifica por la presencia de complejos espiga-onda rápidos, la aparición de estas descargas epileptiformes tiene una latencia de 24 h y su duración promedio es de 5 días.
- En rebanadas de hipocampo, el SAD se caracteriza por el incremento en la amplitud del fEPSP del área CA1 lo que indica cambios sinápticos en la neurotransmisión GABAérgica.
- Conductualmente, el SAD incrementa los niveles de ansiedad.
- El SAD provoca un incremento significativo en la susceptibilidad de inducción de crisis convulsivas.
- El SAD modifica las propiedades farmacológicas del receptor GABA_A: reduce la sensibilidad farmacológica para el agonista endógeno (GABA) y así como también para el antagonista selectivo (Bic).
- El SAD, es un estado de plasticidad neuronal negativa, en el que se desarrolla un incremento de la actividad de la corteza cerebral y del hipocampo que se explican por modificaciones de la principal neurotransmisión inhibitoria del cerebro. Este modelo, tiene semejanzas a otros síndromes de abstinencia como el que genera el GABA y los neuroesteroides.

X Bibliografía

1. Ali A, Ahmad FJ, Pillai KK, Vohora D (2005) Amiloride protects against pentylentetrazole-induced kindling in mice. *Br J Pharmacol* 145(7):880-4.
2. Ali Afia B (2007) Presynaptic Inhibition of GABAA Receptor-Mediated Unitary IPSPs by Cannabinoid Receptors at Synapses Between CCK-Positive Interneurons in Rat Hippocampus. *J Neurophysiol* 98: 861–869.
3. Allison C (2002) Investigations of regional changes in AMPA receptor characteristics during diazepam withdrawal. PhD thesis, University of Strathclyde.
4. Allison C, Claase LA, Pratt JA (2002) Diazepam withdrawal-induced anxiety and place aversion in the rat: differential effects of two chronic diazepam treatment regimes. *Behav Pharmacol* 13: 417–425.
5. Allison C, Pratt JA (2006) Differential Effects of Two Chronic Diazepam treatment Regimes on Withdrawal Anxiety and AMPA Receptor Characteristics. *Neuropsychopharmacol* 31: 602–619.
6. Allison C, Pratt JA, Ripley TL, Stephens DN (2005) AMPA receptor autoradiography in mouse brain following single and repeated withdrawal from diazepam. *Eur J Neurosci* 21: 1045–1056.
7. Alvarenga JM, Loyola F, Firmo JO, Lima-Costa MF, Uchoa E (2007) Prevalence and sociodemographic characteristics associated with benzodiazepines use among community dwelling older adults: The Bambuí Health and Aging Study (BHAS). *Rev Bras Psiquiatr* Oct 31: 35-46.
8. Ameri A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Neurobiol* 58: 315–348.
9. Araki T, Kiyama H, Tohyama M (1992a) The GABA_A receptor α 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Mol Brain Res* 15: 121-132.
10. Araki T, Kiyama H, Tohyama M (1992b) Region specific expression of GABA_A receptor α 3 and α 4 subunits mRNAs in the rat brain. *Mol Brain Res* 12: 293-314.
11. Avoli M, Hwa G, Louvel I, Kurcewicz R, Pumain R, Lacaille JC (1997) Functional and pharmacological properties of GABA mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 526-534.

12. Bagetta G, Sakurada S, Corasaniti MT, Froio F, Nisticò G (1987). Behavioral and electro cortical changes induced by muscimol in rats withdrawn from chronic treatment with diazepam. *Neuropharmacology* 26(7A):725-30.
13. Bantutova I, Ovcharov R, Koburova K (1978). Changes in the convulsion threshold and in the level of brain biogenic amines in rats chronically treated with phenobarbital or diazepam. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 4(2):26-9.
14. Baptista FL, Ferreira R, Cabral A, Moreno CV, Lira BM, Nobre MJ (2007) Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Res* 1166:
15. Bazemore A, Elliott K, Florey E (1956) Factor I and gamma-amino butyric acid. *Nature*. 178:1052-1053.
16. Beckley EH, Fretwell AM, Tanchuck MA, Gililand KR, Crabbe JC, Finn DA (2008). Decreased anticonvulsant efficacy of allopregnanolone during ethanol withdrawal in female Withdrawal Seizure-Prone vs. Withdrawal Seizure-Resistant mice. *Neuropharmacology* 54(2):365-74.
17. Bonnet U, Bingmann D (1995) GABA_A -responses of CA3 neurons: contribution of bicarbonate and of Cl⁽⁻⁾-extrusion mechanisms. *Neuroreport* 6: 700-704.
18. Borman J (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *TINS* 11: 112-116.
19. Bovolin P, Santi M, Memo M, Costa E, Grayson D (1992) Distinct developmental patterns of expression of rat α 1, α 5, γ 2s and γ 2l γ -amino butyric acid-a receptor subunit mRNAs *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 59: 62-72.
20. Bowery N (1990) GABA transporter protein cloned from rat brain. *TIPS* 11: 435-437.
21. Brailowsky S (1991) The GABA-withdrawal syndrome. *Proc West Pharmacol Soc* 34: 227-228.
22. Brailowsky S, García O (1999) Ethanol, GABA and epilepsy. *Arch Med Research* 30: 3-9.
23. Brailowsky S, Kunitomo M, Silva-Barrat C, Menini C, Naquet R (1990) Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia* 31: 227-228.

24. Brailowsky S, Kunimoto M, Silva-Barrat C, Richie D, Naquet R (1988) The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res* 442: 175-179.
25. Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Naquet R (1987) Epileptogenic γ -amino butyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. *Neurosci Lett* 74: 75-80.
26. Brailowsky S, Montiel T, Hernández E, Marescaux C, Vergnes M (1992) Effects of 3-hydroxy,3-ethyl,3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy. *Epilepsy Res* 11: 167-172.
27. Brailowsky S, Silva-Barrat C, Ménini C, Richie D, Naquet R (1989) Effects of localized, chronic GABA infusion into different cortical areas of photosensitive baboons, *Papio, papio*. *Electroencephalography and Clin Neurophysiol* 72: 147-156.
28. Browning M, Bureau M, Dudek E, Olsen R (1990) Protein kinase C and cAMP dependent protein kinase phosphorylate the α subunit of the purified γ -aminobutyric acid A receptor. *PNAS* 87: 1315-1318.
29. Brown J, Wood M, Coldwell M, Briston D (1998) γ -aminobutyric acid A receptor function is desensitized in rat cultured cerebellar granule cells following chronic flunitrazepam treatment. *J Neurochem* 71: 1232-1240.
30. Buck K, Hahner L, Sikela J, Harris A (1991) Chronic ethanol treatment alters brain levels of γ -amino butyric acid A receptor subunit mRNAs: relationship to genetic differences in ethanol withdrawal seizures severity. *J Neurochem* 57: 1452-1455.
31. Bureau M, Laschet J (1995) Endogenous phosphorylation of distinct gamma-amino butyric acid type A receptor polypeptides by Ser/Thr and Tyr kinase activities associated with the purified receptor. *J Biol Chem* 270: 26482-26487.
32. Bureau M, Olsen R (1990) Multiple distinct subunits of the γ -amino butyric acid-A receptor protein show different ligand-binding affinities. *Mol Pharm* 37: 497-502.
33. Calixto E, Lemini C, Montiel T, Brailowsky S (1995) Allopregnanolone potentiated GABA Withdrawal Syndrome. *Neuroscience Letters*. 195: 71-73.
34. Calixto E, López-Colomé AM, Casasola C, Montiel T, Vargas J (2000) Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Res* 39: 13-26.

35. Calixto E, Thiels E, Klann E, Barrionuevo G (2003) Early maintenance of MF LTP depends on protein and RNA synthesis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampus dendritic spines. *J Neurosci* 23: 4842-4849.
36. Casasola C, Bargas J, Arias-Montaña JA, Calixto E, Montiel T, Galarraga E, Brailowsky S (2001) Hippocampal hyperexcitability induced by GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA_A receptors. *Epilepsy Res* 47: 257-271.
37. Casasola C, Montiel T, Calixto E, Brailowsky S (2004) Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neurosci* 126: 163-171.
38. Cash D, Serfozo P, Allan A (1997) Desensitization of a γ -aminobutyric acid type A receptor in rat is increased by chronic treatment with chlorodiazepoxide: a molecular mechanism of dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 704-711.
39. Chebib M, Johnston G (1999) The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 937-940.
40. Churn S, DeLorenzo R (1998) Modulation of GABAergic receptor binding by activation of calcium and calmodulin-dependent kinase II membrane phosphorylation. *Brain Res* 809: 68-76.
41. Clark M (1998) Sensitivity of the rat hippocampal GABA_A receptor α 4 subunit to electroshock seizures. *Neurosci Lett* 250: 17-20.
42. Clark M, Massenburg G, Weiss R (1994) Post analysis of the hippocampal GABA_A receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Mol Brain Res* 26: 309-319.
43. Costa E (1987) Polytypic signaling at GABAergic synapses. *Life sciences* 42: 1407-1417.
44. Covarrubias M, Tapia R (1980) Brain glutamate descarboxilase: properties of its calcium-dependent binding to liposomes and kinetics of the bound and the free enzyme. *J Neurochem* 34: 1682-1688.
45. Cox, Lebalnc, Marshan (1983) *Drugs and drugs abuse*. Addiction Research Foundation, Canada 432 pp.
46. Creager R, Dunwiddie T, Lynch G (1980) Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus. *J Physiol* 299: 409-429.

47. De Ross J, Castilho VM, Brandão ML, Nobre MJ (2008). Analysis of the chronic intake of and withdrawal from diazepam on emotional reactivity and sensory information processing in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(3):794-802.
48. DeLorcy T, Olsen R (1994) GABA and glycine. In: *Basic neurochemistry* (Siegel G, Agranoff B, Molinoff B, eds), New York, USA: Raven press.
49. Depoortere H, Decober M, Honoré L (1983) Drug effects on the various species of laboratory animals. *Neuropsychobiol* 9: 244-249.
50. Deutch A, Roth R (1999) Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond M, Bloom F, Landis S, Roberts J, Squire L, eds), California USA.
51. Dhillon S, Oxley J, Richens A (1982) Bioavailability Of Diazepam After Intravenous, Oral And Rectal Administration In Adult Epileptic Patients. *Br. J. clin. Pharmacol* 13: 427-432.
52. Di Marzo V, Melck D, Bisogno T y De Petrocellis L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Neurosci* 21: 521-528.
53. Diana Marco A y Marty Alain (2004) Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *British Journal of Pharmacol*, 142, 9-19.
54. Doble A, Martin I (1996) The GABA_A/benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. In: *Neuroscience Intelligent Unit*. (Champan, Hill., eds). USA.
55. Emmett-Oglesby MW, Spencer DG Jr, Elmesallamy F, Lal H (1983). The pentylenetetrazol model of anxiety detects withdrawal from diazepam in rats. *Life Sci* 11; 33(2):161-8.
56. Essrich C, Lorez M, Benson J, Fritschy J, Luscher N (1998) Postsynaptic clustering of major GABA(A) receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nature-Neurosci* 1: 563-571.
57. Feldman A, Meyer C, Quesner C (1996) *Principles of Neuropsychopharmacology*. Academic Press.
58. Follesa P, Biggio F, Mancuso L, Cabras S, Caria S, Gorini G, Manca A, Orru A, Biggio G (2004) Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the alpha2 subunit of the GABA_A receptor and its prevention by diazepam or gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 130-137.

59. Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, Massa F, Desole MS, Carta M, Busonero F. (2001) Increase in expression of the GABAA receptor alpha4 subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists. *Brain Res Mol Brain Res* **92**:138–148.
60. Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Mostallino MC, Manca A, Mascia MP, Busonero F, Talani G, Sanna E, Biggio G (2003) Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Molecular Pharmacology* **63**: 896-907.
61. Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G (2006) Neurosteroids, GABAA receptors, and ethanol dependence. *Psychopharmacol* **186**(3):267-80.
62. Foster AC, Kemp JA (2006) Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **6**: 7-17.
63. Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol* **83**: 1017–1066.
64. Fritschy J, Benke D, Mertens S, Oertel H, Bachi T, Mohler H (1992) Five subtypes of type A γ -amino butyric acid receptor identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *PNAS* **89**: 6726-6730.
65. Frosch M, Lipton S, Dichter M (1992) Desensitization of GABA-active current and channels in cultured cortical neurons. *J Neurosci* **12**: 3042-3053.
66. Fukuda H, Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Riche D, Naquet R (1987) Anticonvulsivant effect of intracortical, chronic infusion of GABA in kindled rats: focal seizures upon withdrawal. *Exp Neurol* **98**: 120-129.
67. García-Ugalde G, Brailowsky S (1993) Los receptores del GABA: de la electrofisiología a la biología molecular. *Ciencia* **44**: 279-289.
68. García-Ugalde G, Galarraga E, Bargas J, Brailowsky S (1992) Hyperexcitability of hippocampal CA1 region in brain slices after GABA withdrawal. *Neurosci Lett*, **147**(2):229-32.
69. Gonzalez JP, McCulloch AJ, Nicholls PJ, Sewell RD, Tekle A (1984) Subacute benzodiazepine treatment: observations on behavioral tolerance and withdrawal. *Alcohol Alcohol* **19**(4):325-32.

70. Goodman GA, Ruddon RW, Molinoff PB, Limbird LE, Hardman JG (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. McGraw-Hill interamericana. Novena edición, vol. II y II.
71. Greenblatt DJ, Shader, R.I. (1978) Dependence tolerance, and addiction to benzodiazepines: clinical and pharmacokinetic considerations. *Drug Metab. Rev* 8, 13-28.
72. Grover L, Lambert N, Schwartzkroin P, Teyler T (1993) Role of HCO_3^- in depolarizing GABA_A receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *Neurophysiol* 69: 1541-1555
73. Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czysyk L, Keynan S, Miedel M, Davidson N, Lester H, Kanner B (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303-1306.
74. Gupta N, Bhargava VK, Pandhi P (2000) Tolerance and withdrawal to anticonvulsant action of clonazepam: role of nitric oxide. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22(4):229-35.
75. Hadingham K, Harkness P, McKernan R, Quirk K, Bourdelles B, Horne A, Kemp J, Barnard A, Ragan I, Whiting P (1992) Stable expression of mammalian type A γ -aminobutyric acid receptors in mouse cells: demonstration of functional assembly of benzodiazepine-responsive sites. *PNAS* 89: 6378-6392.
76. Hansen SL, Sperling BB, Sánchez C (2004) Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 (1):105-13.
77. Hawkins M, Pan W, Stefanovich P, Radulovacki M (1988) Desensitization of adenosine A_2 receptors in the striatum of the rat following chronic treatment with diazepam. *Neuropharmacol* 27(11):1131-40.
78. Hevers W, Luddens H (1998) The diversity of GABA_A receptors. *Mol Neurobiol* 18: 35-86.
79. Hirouchi M, Ohkuma S, Kuriyama K (1992) Muscimol-induced reduction of GABA_A receptor alpha 1-subunit mRNA in primary cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 15: 327-331.
80. Houser C, Vaughn J, Hendry S, Jones E, Peters A (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. Functional properties of cortical cells 2.
81. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K., Martin BR, Mechoulam R. y Pertwee

RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol* 54:161–202.

82. Impagnatiello F, Pesold C, Longone P, Caruncho H, Fritschy J, Costa E, Guidotti A (1996) Modifications of γ -amino butyric acid A receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to diazepam. *Mol Pharmacol* 49: 822-831.

83. Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E (2001) Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6):3483-8.

84. Jongsma ML, van Rijn CM, van Egmond J, van Schaijk WJ, Sambeth A, Coenen AM (2000) The influence of diazepam on the electroencephalogram-evoked potential interrelation in rats. *Neurosci Lett* 27; 293(2):83-6.

85. Kardos J (1999) Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34: 353-358.

86. Karlsson G, Pozza M, Olpe H (1988) Phaclofen: a GABA_B blocker reduces long duration inhibition in the neocortex. *Eur J Pharmacol* 148: 485-486.

87. Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor J, Bishof S, Mickel S, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froesti W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239-246.

88. Kerr D, Ong J, Prager R, Gynther B, Curtis D (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res* 405: 150-154.

89. Knapp R, Malatynska E, Yamamura H (1990) From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. *Neurochem Res* 15: 103-112.

90. Komatsu Y (1996) GABA_B receptors, monoamine receptors, and postsynaptic inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J Neurosci* 6342-52.

91. Korkmaz S, Wahlström G (1999) Physical dependence after benzodiazepine treatments in rats: Comparison of short and long treatments with diazepam and lorazepam. *J Stud Alcohol* 60(4):546-54.

92. Kreitzer AC y Regehr WG (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto purkinje cells. *Neuron* 29: 717–727.

93. Krishek B, Xie X, Blackstone C, Haganir R, Moss S, Smart G (1994) Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12: 1081-1095.
94. Krnjević K (1984) Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account. In: *Functional properties of cortical cells*. New York USA. Plenum.
95. Krnjević K (1991) Significance of GABA in brain function. In: *GABA mechanism in epilepsy* wiley-Liss, Inc. USA.
96. Krnjević K (1997) Role of GABA in cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 439-451.
97. Kuffler S, Nichols J, Martin A (1984) *From neuron of the brain*. Massachusetts.
98. Kuriyama K, Hirouchi M, Nakayasu H (1993) Structure and function of cerebral GABA_A and GABA_B receptors. *Neurosci Res* 17: 91-99.
99. Lader M (1994) Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur Neuropsychopharmacol* 4: 81-95.
100. Lader M, File S (1987) The biological basis of benzodiazepine dependence. *Psychol Med* 17: 537-547.
101. Lambert N, Harrison N (1990) Analogs of cyclic AMP decrease γ -amino butyric acid a receptor mediated chloride current in cultured rat hippocampal neurons via an extracellular site. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 90-94.
102. LeGal La Salle G, Brailowsky S, Menini C, Naquet R (1988) Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp Neurol* 101: 411-417.
103. Leidenheimer N, Chapell R (1997) Effects of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Mol Brain Res* 52: 173-181.
104. Leidenheimer N, McQuilkin S, Hahner L, Whiting P, Harris A (1992) Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ -amino butyric acid A receptor: role of desensitization. *Mol Pharmacol* 41: 1116-1123.
105. Lemtiri-Chlieh Fouad y Levine Eric S (2007) Lack of Depolarization-Induced Suppression of Inhibition (DSI) in Layer 2/3 Interneurons That Receive Cannabinoid-Sensitive Inhibitory Inputs. *J Neurophysiol* 98: 2517–2524.

106. Liu Q, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1992) A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *PNAS* 89: 6639-6643.
107. Llano I, Leresche N, Marty A (1991) Calcium entry increases the sensitivity of cerebellar Purkinje cells to applied GABA and decreases inhibitory synaptic currents. *Neuron* 6:565-574.
108. Llorente MD, David D, Golden AG, Silverman MA (2000) Defining patterns of benzodiazepine use in older adults. *J Geriatric Psychiatry Neurol* 13(3):150-60.
109. Löscher W, Rundfeldt C, Hönack D, Ebert U (1996) Long-term studies on anticonvulsant tolerance and withdrawal characteristics of benzodiazepine receptor ligands in different seizure models in mice. I. Comparison of diazepam, clonazepam, clobazam and abecarnil. *J Pharmacol Exp Ther* 279(2):561-72.
110. Luddens H, Korpi R, Seeburg H (1995) GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiologic implications. *Neuropharmacol* 34: 245-254.
111. Macdonald R, Olsen R (1994) GABA_A receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 17: 569-602.
112. Manchikanti L, Brown K, Pharm, R, Singh V. (2002) National All Schedules Prescription Electronic Reporting Act (NASPER): Balancing Substance Abuse and Medical Necessity. *Pain Physician* 5(3):294-319.
113. Mandema JW, Danhof M (1992) Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinetic* 23(3):191-215.
114. Mark L, Waltzman M (1999) Flunitrazepam: A review of "roofies". *Ped Emer Care* 5: 59-60.
115. Martin IL (1987) The benzodiazepines and their receptors: 25 years of progress. *Neuropharmacol* 26: 957-970.
116. Mathey HG (1965) Treatment of autonomic functional syndromes with 7-chloro-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one. *Arzneimittelforschung* 15(4):374-6.
117. McKernan R, Whiting P (1996) Which GABA_A receptors subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143.

118. McLellan A, O'Brien C, Metzger D, Alterman A, Cornish J, Urshel H (1992) How effective is substance abuse treatment –compared to what? Addictive states. pp 231-252. New York: Raven press.
119. Medeiros F das C, Medeiros MA, Rao VS, Figueiredo EG (1997) Effects of misoprostol on pentylenetetrazol-induced seizures in mice. *Arq Neuropsiquiatr* 55(4):677-9.
120. Medina-Mora, M. E., Villatoro, J., Fleiz, C. (1999). Uso indebido de sustancias. En: Estudio de niños, niñas y adolescentes entre 6 y 17 años. Trabajadores en 100 ciudades. Vol. 7:369-374.
121. Mehta A, Ticku M (1999) An update on GABA_A receptors. *Brain Res Rev* 29: 196-217.
122. Mellerio F (1980) Contribution of electroencephalography in tranquilizer withdrawal syndromes. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 10(1):95-103.
123. Mhatre M, Ticku M (1992) Chronic ethanol administration alters gamma butyric acid a receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 42: 415-422.
124. Midel G (1981) *Pharmacology*. USA: Englasood Cliffs.
125. Misztal-Dethloff B, Stepień H, Komorowski J (2005) Effect of diazepam and chlorpromazine on proliferative activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured endothelial HECa10 cells in vitro. *Pharmacol Rep* 57(5):670-4.
126. Mohler H (2006) GABA_A receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 731-740.
127. Mohler H, Fritschy J. M, Rudolph U (2002) A New Benzodiazepine Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 2-8.
128. Montiel T, Almeida D, Arango I, Calixto E, Casasola C, Brailowsky S (2000). Long-lasting effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat. *Neural Plast* 7(1-2):1-8.
129. Moran MH, Smith SS (1998) Progesterone withdrawal I: pro-convulsant effects. *Brain Res* 807(1-2):84-90.
130. Myrick H y Anton RF (1998) Treatment of alcohol withdrawal. *Alcohol Health Res World* 22(1):38-43.

131. Naor S, Talmon Y, Guy N (1992) Combined tricyclic antidepressants and ritalin in elderly depressives. *Harefuah* 123(7-8):251-2, 307.
132. Navarro JF, Burón E, Martín-López M (2006) Anxiolytic-like activity of SB-205384 in the elevated plus-maze test in mice. *Psicothema* 18(1):100-4.
133. Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS* 269: 181-184.
134. Nurse S, Lacaille J (1997) Do GABA_A and GABA_B inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can J Physiol Pharmacol* 75: 520-525.
135. O'Brien C (1996) Addiction and abuse of substance. In: *The Pharmacological basis of therapeutics*. (Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman A, eds), pp 595-617.
136. Ohmori Y, Kuriyama K (1991) Pharmacological and biochemical characteristics of partially purified GABA_B receptor. *Neurochem Res* 16: 357-362.
137. Ohno-Shosaku T, Tsubokawa H, Mizushima I, Yoneda N, Zimmer A y Kano M (2002) Presynaptic cannabinoid sensitivity is a major determinant of depolarization-induced retrograde suppression at hippocampal synapses. *J Neurosci* 22: 3864–3872.
138. Olkkola KT, Ahonen J (2008) Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol* 182:335-60.
139. Olsen R, Tobin A (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J* 4: 1469-1480.
140. Palencia G, Calderon A, Sotelo J (2007) Thalidomide inhibits pentylenetetrazole-induced seizures. *J Neurol Sci* 15; 258(1-2):128-3.
141. Papadopoulos V (1993) Peripheral-Type Benzodiazepine /Diazepam Binding Inhibitor Receptor: Biological Role in Steroidogenic Cell Function. *Endocrine Reviews* 14 (2): 222-240.
142. Paul S (1995) GABA and glycine. In: *Neuropharmacology: the fourth generation of progress* (Bloom F, Kupfer J, eds), New York, USA: Raven.
143. Perkins K, Wong R (1997) The depolarizing GABA response. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 516-519.

144. Pesold C, Caruncho J, Impagnatiello F, Berg M, Fritschy J, Guidotti A, Costa E (1997) Tolerance to diazepam and changes in GABA receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neurosci* 79: 477-487.
145. Petursson H, Lander M (1984) Dependence on tranquilliser. *Maudsley Monograph*. Oxford University Press, Oxford 28.
146. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A y Rodriguez De Fonseca F (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic rugs. *TIPS* 21: 218–224.
147. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101(4):815-50.
148. Pitler TA y Alger BE (1992) Postsynaptic pike firing reduces synaptic GABA_A responses in hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 12: 4122–4132.
149. Pitler TA y Alger BE (1994) Depolarization-induced suppression of GABAergic inhibition in rat hippocampal pyramidal cells: G protein involvement in a presynaptic mechanism. *Neuron* 13: 1447–1455.
150. Preuss UW, Bahlmann M, Koller G, Soyka M (2000). Treatment of cocaine dependence. Intoxication, withdrawal and prevention of relapse. *Fortschr Neurol Psychiatr* 68(5):224-38.
151. Puia G, Ducic I, Vicin S, Costa E (1993) Does neurosteroid modulator efficacy depend on GABA_A receptors subunit composition? *Receptors and Channels* 1: 135-142.
152. Reddy DS, Kim HY, Rogawski MA (2001) Neurosteroid withdrawal model of perimenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsia* 42(3):328-36.
153. Ribeiro CS, Soares CA, Franco V, Botega N (2007) Chronic use of diazepam in primary healthcare centers: user profile and usage pattern. *Sao Paulo Med J* 125 (5):270-4.
154. Roberto M, Bajo M, Crawford E, Madamba SG, Siggins GR (2006) Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDA receptors in central amygdale. *Neuropsychopharmacol* 31(5):988-96.
155. Robinson G, Setters E, Janecek E (1981) Barbiturate and hypnosedative withdrawal by a multiple oral phenobarbital loading dose technique. *Clin Pharmacol Ther* 30: 71-76.
156. Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21(6):801-10

157. Ruano D, Cano J, Machado A, Vitorica V (1991) Pharmacologic characterization of GABA_A/benzodiazepine receptor in rat hippocampus during aging. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 902-908.
158. Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R (1994) Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of γ -amino butyric acid. *Neurochem Int* 24: 363-368.
159. Schlicker E., Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Pharmacol.* 22: 565–572.
160. Shader RI, Greenblatt DJ (1981) The Use of Benzodiazepines In Clinical Practice. *Br. J. clin. Pharmacol* 11, 5S-9S
161. Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoyer H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem Int* 34: 379-385.
162. Silva-Barrat C, Araneda S, Menini C, Champagnat J, Naquet R (1992) Burst generation in neocortical neurons after GABA withdrawal in the rat. *J Neurophysiol* 67: 715-727.
163. Silva-Barrat C, Brailowsky S, Richie D, Menini C (1988) Anticonvulsant effects of localized chronic infusions of GABA in cortical and reticular structures of Baboons. *Exp Neurol* 101: 418-427.
164. Smith SS, Gong Q, Li X, Moran M, Bitran D, Frye C, Hsu F (1998) Withdrawal from 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one using a pseudo pregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA_A -gated current and increases the GABA_A receptor α 4 subunit it association with increased anxiety. *J Neurosci* 18: 5275-5284.
165. Soltesz I, Haby M, Leresche N, Crunelli V (1988) The GABA_B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺ dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. *Brain Res* 448: 351-354.
166. Song J, Shen G, Greenfield LJ Jr, Tietz EI (2007) Benzodiazepine withdrawal-induced glutamatergic plasticity involves up-regulation of GluR1-containing α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in Hippocampal CA1 neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 322(2):569-81.
167. Spies CD, Otter HE, Hüske B, Sinha P, Neumann T, Rettig J, Lenzenhuber E, Kox WJ, Sellers EM (2003) Alcohol withdrawal severity is decreased by symptom-orientated adjusted bolus therapy in the ICU. *Intensive Care Med* 29(12):2230-8.

168. Squires RF (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacol* 22: 1443-1450.
169. Staley K, Proctor W (1999) Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. *J Physiol (Lond)* 519: 693-712.
170. Staley K, Soldo B, Proctor W (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269: 977-981.
171. Stelzer A, Kay A, Wong S (1988) GABA_A receptor functional in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 241: 339-341.
172. Steppuhn KG, Turski L (1993) Diazepam dependence prevented by glutamate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15; 90(14):6889-93.
173. Sternbach LH (1979) The benzodiazepine story. *J Med Chem* 22 (1):1-7.
174. Tapia R, Sandoval M (1971) Study of inhibition of brain of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphattoxime -O-acetic acid. *J Neurochem* 18: 2051-2059.
175. Tapia R, Sandoval M, Contreras P (1975) Evidence for a role of glutamate decarboxylase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J Neurochem* 12: 1283-1285.
176. Tareilus E, Schoch J, Breer H (1994) GABAB-receptor-mediated inhibition of calcium signals in isolated nerve terminals. *Neurochem Int*
177. Teuber L, Watjens F, Jensen L (1999) Ligands for the benzodiazepine binding site-a survey. *Curr Pharm Des* 5: 317-343.
178. Thompson C, Bodewits G, Stephenson A, Turner J (1992) Mapping of GABA_A receptor α5 and α6 subunit like immunoreactivity in rat brain. *Neurosci Letters* 144: 53-56.
179. Thompson S, Gahwiler B (1992) Comparison of the actions of baclofen at pre and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol* 451: 329-345.
180. Tobler I, Kopp C, Deboer T, Rudolph U (2001) Diazepam-induced changes in sleep: Role of the α1 GABAA receptor subtype. *Pharmacol* 98 (11): 6464-6469.
181. Toone BK y Fenton GW (1977) Epileptic seizures induced by psychotropic drugs. *Psychol Med* 7(2):265-70.

182. Traub RD, Jefferys JG (1994) Are there is unifying principles underlying the generation of epileptic after discharges in vitro? *Prog Brain Res* 102: 383-394.
183. Tzunashima K, Schwarzer C, Kichmair E, Sieghart W, Sperk G (1997) GABA_A receptor subunit in the rat hippocampus III. Altered messenger RNA expression in kainic acid -induced epilepsy. *Neurosci* 80: 1019-1032.
184. Van Sickle BJ, Xiang K, Tietz EI (2004) Transient plasticity of hippocampal CA1 neuron glutamate receptors contributes to benzodiazepine withdrawal-anxiety. *Neuropsychopharmacol* 29(11):1994-2006.
185. Vicens C, Fiol F, Llobera J, Campoamor F, Mateu C, Alegret S, Socías I (2006) Withdrawal from long-term benzodiazepine use: randomized trial in family practice. *British Journal of General Practice* 56: 958–963.
186. Vincent P, Armstrong CM, Marty A (1992) Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization. *J Physiol* 456: 453–471.
187. Wafford KA, Bain CJ, Quirk K, McKernan RM, Wingrove PB, Whiting PJ, Kemp JA (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABA_A receptor beta subunit. *Neuron* 12: 775-782.
188. Wala EP, Sloan JW, Jing X, Holtman JR Jr (1999) Precipitated withdrawal in the substantia nigra in diazepam-dependent female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64(4):857-68.
189. Wang J, Kofuji P, Burt D (1992) Strain comparisons and developmental profile of the delta subunit of the murine GABA_A receptor. *Brain Res Bull* 29: 119-123.
190. Ward BO, Stephens DN (1998) Sensitization of withdrawal signs following repeated withdrawal from a benzodiazepine: differences between measures of anxiety and seizure sensitivity. *Psychopharmacol* 135(4):342-52.
191. Wilcox A, Warrington J, Gardiner K, Berger R, Whiting P, Altherr M, Wasmuth J, Patterson D, Sikela J (1992) Human chromosomal localization of genes encoding the γ 1 and γ 2 subunits of the γ -amino butyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *PNAS* 89: 5857-5861.
192. Wilson RI, Kunos G y Nicoll RA (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31: 453–462.

193. Woods JH, Winger G (1997) Abuse of Flunitrazepam. *J of clin Psychopharmacol* 17: 1S-57S.
194. Wu J, Chang Y, Li G, Xue F, Dechon J, Elisworth K, Liu Q, Yang K, Bahadroani N, Zheng C, Zhang J, Rekate H, Rho JM, Kerrigan JF (2007) Electrophysiological properties and subunit composition of GABA_A receptors in patients with gelastic seizures and hypothalamic hamartoma. *J Neurophysiol* 98: 5-15.
195. Xiang K, Tietz EI (2007) Benzodiazepine-induced hippocampal CA1 neuron alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor plasticity linked to severity of withdrawal anxiety: differential role of voltage-gated calcium channels and N-methyl-D-aspartic acid receptors. *Behav Pharmacol* 18(5-6):447-60
196. Zhai J, Stewart R, Friedberg M, Li C (1998) Phosphorylation of the GABA(A) receptor gamma 2L subunit in rat sensory neurons may not be necessary for ethanol sensitivity. *Brain Res* 805: 116-122.
197. Zhang J, Sato M, Tohyama M (1992) Co expression of the $\alpha 1$ and $\beta 2$ subunit genes of the GABA_A receptor in the magnocellular preoptic nucleus. *Mol Brain Res* 15: 171-173.
198. Zhang LS, Ma YY, Li Q (2006) Effects of endogenous histamine on memory impairment induced by pentylenetetrazole-kindled epilepsy in rats. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 35(6):630-4.
199. DSM-IV-TR Manual de diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Criterios Diagnósticos. Masson. 2002. 347 pp.
200. Guía para el cuidado y uso de los animales en laboratorio. Academia Nacional de Medicina, 1999. 146 pp.
201. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Dirección General de Epidemiología, Consejo Nacional contra las Adicciones. Encuesta Nacional de Adicciones, 2002.
202. World Health Organization (2003) Who Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-third Report.
203. <http://www.cij.gob.mx/Paginas/MenuIzquierdo/InformacionPara/Familia/ComoProteger/consumodrogas/quienesconsumen.asp>
204. Neurociencias. Purves D. Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W., Lamantia AS., MacNamara J., Williams S. Ed. Panamericana. 3a Ed. México. 2006. 856 pp.