



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN PSICOLOGÍA
NEUROCIENCIAS DE LA CONDUCTA**

**EFFECTO DEL CONTEXTO EN EL DESARROLLO DE LA TOLERANCIA
Y TOLERANCIA CRUZADA A LOS EFECTOS ANSIOLITICOS DEL
DIAZEPAM Y MIDAZOLAM**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN PSICOLOGIA

P R E S E N T A

BENITA CEDILLO ILDEFONDO

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

DIRECTORA: DRA. SARA E. CRUZ MORALES

COMITÉ: DR. JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ

DRA. SELENE CANSINO ORTIZ

DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ-GUASTI

DR. JOSE CRISTÓBAL PEDRO ARRIAGA RAMÍREZ

DR. FLORENCIO MIRANDA HERRERA

DRA. ROSALVA CABRERA CASTAÑÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sara E. Cruz Morales por sus asesorías y valiosa colaboración para la realización de esta investigación a lo largo del curso del Doctorado.

Al Comité tutorial: DR. JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ

DRA. SELENE CANSINO ORTIZ

DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ-GUASTI

DR. JOSE CRISTÓBAL PEDRO ARRIAGA RAMÍREZ

DR. FLORENCIO MIRANDA HERRERA

DRA. ROSALVA CABRERA CASTAÑÓN

A cada uno, agradezco sus excelentes comentarios y observaciones a lo largo del proceso del Doctorado, para enriquecer este trabajo.

Norma Laura y María Reyes, gracias por su gran apoyo en los momentos que lo requerí.

A cada uno de mis alumnos que me apoyaron en la parte experimental, especialmente a Miguel Quezada y Donancy. Muchas gracias.

INDICE	Pág.
Resumen-----	1
Introducción-----	2
I. Tolerancia -----	5
1.1 Definición -----	5
1.2 Tipos de tolerancia -----	6
1.3 Tolerancia por forma de administración -----	8
1.4 Medidas de tolerancia -----	9
2. Benzodiazepinas -----	10
2.1 Propiedades Farmacológicas -----	11
2.2 Absorción y distribución -----	12
2.3 GABA -----	13
2.3.1 Bioquímica del GABA -----	13
2.3.2 Receptores -----	14
2.4 Tolerancia de las benzodiazepinas-----	18
2.5 Diazepam y Midazolam -----	24
3. Ansiedad-----	25
3.1 Modelos de ansiedad-----	27
3.1.1 Modelo del laberinto elevado en cruz -----	29
4. Efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia condicionada -----	31
5. Importancia de las señales droga en el desarrollo de tolerancia al etanol	38
5.2 Tolerancia a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas -----	42
6. Actividad motora -----	43
7. Justificación -----	46
8. Método General -----	48
9. Experimento 1 -----	51
9.1 Experimento 1 A -----	51
9.2 Experimento 1 B -----	53
10. Experimento 2 -----	55
10.1 Experimento 2 A -----	55
10.2 Experimento 2 B -----	58
11. Experimento 3 -----	62
11.1 Experimento 3 A -----	62
11. 2 Experimento 3 B -----	65
12. Experimento 4 -----	71
12. 1 Experimento 4 A -----	71

13. Experimento 5 -----	74
13.1 Experimento 5 A -----	74
13.2 Experimento 5 B -----	77
14. Experimento 6 -----	84
14.1 Experimento 6 A -----	84
15. Experimento 7 -----	86
15.1 Experimento 7 A -----	86
15.2 Experimento 7 B -----	88
16. Discusión general-----	92
Referencias-----	107

RESUMEN

Farmacológicamente la tolerancia se refiere a la disminución de la respuesta a un fármaco como consecuencia de administraciones repetidas. El modelo pavloviano explica que una pérdida de la tolerancia puede ocurrir si la droga es administrada en un contexto que no tiene historia de asociación con la administración de la droga. Es importante entender la importancia que tiene el contexto en el desarrollo, disminución o pérdida de la tolerancia como una explicación a nivel conductual y no sólo a nivel farmacológico. Por lo anterior, se evaluó el efecto del contexto en la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam (D) y midazolam (M). En el Experimento 1 se demostró el efecto ansiolítico del D y M; en el Experimento 2 se asoció el contexto (estímulo discreto, Ruido) con la administración de D y M, en ambos casos se detectó el desarrollo de tolerancia, indicado por un menor efecto ansiolítico independientemente del contexto donde se les evaluó, infiriendo que los sujetos no perciben en forma aislada el estímulo ruido, sino más bien en forma configuracional. Por lo que en el Experimento 3 se manipuló el contexto como un todo: Bioterio (B) conformado por todos los estímulos de este ambiente y el laboratorio donde se realizaron las pruebas a los sujetos. Sólo en el caso del M se observó el efecto del contexto, por lo que se concluyó que el contexto es una variable importante en el análisis del desarrollo de tolerancia cuando se manipula como una unidad de estímulos, más que como un estímulo aislado. En el Experimento 4, se evaluó el efecto del antagonista a benzodiazepinas, flumazenil sobre la tolerancia, los resultados mostraron la reversión de la tolerancia al efecto ansiolítico de las benzodiazepinas en los sujetos que fueron evaluados en el mismo contexto de sus administraciones y la reversión del efecto de contexto en los sujetos que se evaluaron en un contexto diferente al de sus administraciones. Por último, el Experimento 5, evaluó el efecto del contexto en la tolerancia cruzada al etanol a ambas benzodiazepinas, los resultados mostraron el desarrollo de tolerancia cruzada al etanol por las previas administraciones de D y M dependiente del contexto donde se realizó la prueba. En la actividad motora, los resultados en general no mostraron cambios significativos debido al tratamiento en la actividad vertical y horizontal, se observó el proceso de habituación como resultado del paso del tiempo, lo cual sugiere que las dosis empleadas no fueron suficientes para modificar la actividad motora. Estos resultados sugieren que los mecanismos asociativos median el efecto de la droga de manera diferente a los mecanismos no asociativos (farmacológicos) en el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del D y M, y de la tolerancia cruzada al etanol.

INTRODUCCIÓN

La disminución de la respuesta a un fármaco como consecuencia de su administración repetida recibe el nombre de tolerancia, la cual ha sido definida como la necesidad de incrementar la dosis de una droga para mantener su efectividad después de administraciones repetidas (Kalant, LeBlanc & Gibbens, 1971). Varias teorías enfatizan el papel de procesos asociativos en el desarrollo de la tolerancia (Baker & Tiffany, 1985, Siegel, 1989, Poulos & Cappell, 1991).

Con base en los planteamientos de Pavlov (1927), un ensayo de condicionamiento consiste en la asociación de los estímulos que regularmente preceden a la droga y que funcionan como estímulos condicionados (EC) para los efectos de la droga, la cual funciona como estímulo incondicionado (EI) y la consecuencia de esta asociación es una respuesta condicionada (RC) a los estímulos asociados con la presentación de la droga. La administración repetida de la droga produce la formación de una asociación entre el EC ambiental y EI farmacológico. La manifestación de esta asociación, en muchos de los casos, es el desarrollo de una respuesta condicionada compensatoria (RCC) opuesta en dirección a los efectos de la droga administrada, y que puede ser capaz de cancelar o reducir el efecto de la misma. Entonces el desarrollo de la tolerancia a una droga puede ser explicada en algunos casos como el desarrollo de una RC opuesta a los efectos farmacológicos de aquella.

De acuerdo a lo anterior, un organismo con una historia de administración de alguna droga asociada a un contexto presentará una mayor tolerancia cuando la droga se administra en el mismo contexto de estímulos previamente asociados con ésta, y menor tolerancia cuando se administran en un contexto de estímulos no asociados a la droga. Esto ha sido demostrado con diferentes drogas como la anfetamina (Poulos, Wilkinson & Cappell, 1981), el pentobarbital (Hinson, Poulos & Cappell, 1982; Vila & Cedillo, 1991), etanol (Cedillo, 2001), el haloperidol (Hinson, Poulos & Thomas, 1982) y la escopolamina (Poulos & Hinson, 1984). Lo que sugiere que la tolerancia se ve influida tanto por mecanismos farmacológicos como por factores de aprendizaje.

A nivel clínico la comprensión de estos mecanismos de alguna forma ayudaría a entender la farmacodpendencia hacia algunas drogas y tal vez en el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento de la fármacodependencia.

Así que algunas razones para estudiar la tolerancia, además de la fármacodependencia, son:

- 1) El que pacientes psiquiátricos a quienes se les administran drogas por tratamientos prolongados, pueden desarrollar tolerancia rápidamente a la droga, complicando así el tratamiento.
- 2) El que estos dos fenómenos estén relacionados explica el hecho de que en la fármacodependencia los sujetos llegan a depender físicamente de las drogas, porque los efectos iniciales de la sustancia de abuso disminuyen con la exposición repetida, cuando se desea obtener el efecto inicial de la droga, los sujetos tienen que incrementar la dosis de la sustancia consumida. Otro problema son los síntomas de retirada por los efectos menores de una dosis fija, para que estos desaparezcan se tiene que consumir la droga de abuso.
- 3) El estudio de las condiciones bajo las cuales se desarrolla la tolerancia puede proporcionar información acerca de las formas en las que un organismo se adapta a los efectos por la administración repetida de una droga.

En la presente investigación se reportan los resultados de seis experimentos con el propósito de proporcionar más evidencia del efecto del contexto condicionado en la modulación de la tolerancia.

En la primera parte de este trabajo se describen los aspectos relacionados con la tolerancia. En la segunda parte se presenta información de la tolerancia a las benzodiazepinas y su farmacología, el neurotransmisor GABA, sus receptores y su relación con el desarrollo de la tolerancia. En la tercera parte se presenta una breve descripción de la ansiedad y los modelos para evaluar ésta en roedores, específicamente el modelo del laberinto elevado en cruz.

En la cuarta parte se presenta evidencia disponible del modelo de condicionamiento de la tolerancia, el cual es esencial en esta investigación para apoyar y extender sus resultados, específicamente sobre la evidencia de cómo los procesos asociativos del modelo Pavloviano pueden controlar la

presencia o ausencia de la tolerancia al efecto de una droga. En la quinta parte se describe información relacionada con la tolerancia cruzada condicionada. Y finalmente se reportan los experimentos cuyos resultados se esperan que contribuyan a la comprensión y entendimiento de las condiciones y mecanismos de la tolerancia condicionada. En la última parte, se revisa cómo la actividad motora es alterada por los efectos de las benzodiazepinas.

I. Tolerancia

Con el uso crónico de drogas se observa la capacidad de algunas sustancias, pero no de otras, para producir tolerancia y/o dependencia física, fenómenos fuertemente asociados entre sí (Goldstein, Aranow & Kalman, 1974).

Estos fenómenos se han observado en consumidores de alcohol que manifiestan efectos cada vez menores hacia el alcohol, o bien por observaciones clínicas de la disminución de los efectos de los barbitúricos, hipnóticos, tranquilizantes y otros fármacos.

1.1 Definición

La tolerancia se define como “un estado de disminución de la respuesta a los efectos de un fármaco debido a la exposición previa a fármacos relacionados, por lo que una dosis mayor a la administrada inicialmente debe administrarse para reinstalar los efectos iniciales de la droga. La palabra tolerancia se usa frecuentemente para sugerir que todos los efectos de una droga disminuyen a la misma razón, pero algunos efectos de una droga podrían desarrollar tolerancia rápidamente, otros efectos podrían sólo mostrar una lenta tolerancia, y algunos efectos podrían nunca mostrar tolerancia. Por ejemplo uno de los efectos de la morfina, son náusea y vómito, estos efectos muestran una rápida tolerancia, pero la capacidad de la morfina para constreñir la pupila del ojo muestra una menor tolerancia (McKim, 1986).

Una vez que se desarrolla la tolerancia, ésta no es indefinida y tiende a desaparecer por procesos de aprendizaje y cambios a nivel de receptores, con el paso del tiempo después de que el uso de la droga es discontinuado, tal desaparición puede presentarse por aumento de la dosis de la droga, ausencia de los estímulos presentes durante las administraciones previas y puede tener lugar a diferentes tasas para diferentes efectos de la droga (McKim, 1986).

1.2 Tipos de Tolerancia:

Tolerancia Farmacocinética

También llamada tolerancia metabólica está determinada por una serie de características del fármaco como tipo de fármaco (vida media, potencia) y factores como la absorción, vía de administración, distribución, metabolismo y eliminación que modifican la concentración de la droga disponible en los sitios de acción. La vida media de una droga, es el tiempo que tarda en eliminarse el 50% de la concentración plasmática alcanzada por una dosis de un fármaco (Montesinos & López-Corral, 1990) y se ha observado que las drogas con vida media corta desarrollan más rápidamente tolerancia (Ellinwood, Nikaido, Heeatherly y Bjornsson, 1987; Irvine, Cheeta, Lovelock y File, 2001). Otra característica importante de la droga es su potencia, que se refiere a la cantidad de fármaco (generalmente expresada en miligramos) que se necesita para producir un efecto, como aliviar el dolor o disminuir la presión arterial. Por ejemplo, si 5 miligramos de fármaco B alivian el dolor con la misma eficacia que 10 miligramos de fármaco A, entonces el fármaco B es dos veces más potente que el fármaco A.

Tolerancia Farmacodinámica:

Esta describe un tipo de tolerancia que se origina de algunos ajustes que hace el organismo para compensar el efecto de la presencia continua de la droga. Por ejemplo, si una droga bloquea un receptor en una sinapsis, el organismo podría tratar de compensar tal bloqueo creando más receptores de modo que el neurotransmisor y la sinapsis puedan ser restaurados para un funcionamiento normal para compensar la presencia continua de la droga (Le, Mihic & Wu, 1992). Cuando los receptores se adaptan a la presencia continua de la droga, si el tratamiento se suspende, se puede observar una actividad anormal como son los efectos de la abstinencia, lo que es indicativo del fenómeno de dependencia (Hutchinson, Smith & Darlington, 1996).

Una de las funciones de la tolerancia es restaurar la homeostasis, elevando el funcionamiento fisiológico dentro de un rango normal

Tolerancia Conductual:

La tolerancia conductual, consiste en un cambio en las respuestas hacia las drogas debido a dos mecanismos conductuales. Uno se basa en el condicionamiento operante y el otro en el condicionamiento clásico. La

tolerancia conductual de tipo operante tiene lugar cuando el organismo aprende a través del condicionamiento operante a cambiar la conducta para compensar los efectos de la droga. Campbell y Seiden (1973, citados en McKim, 1986), fueron de los primeros autores que investigaron esta área. Ellos entrenaron a ratas a responder por reforzamiento con comida en un programa de reforzamiento de tasas bajas, donde el animal era reforzado sólo si esperaba un período fijo de tiempo entre respuestas. Durante 28 días se aplicaron pre-tratamientos de Anfetamina a un grupo de ratas antes de colocarlas en la caja de Skinner. Otro grupo de animales estuvo bajo las mismas condiciones, pero la Anfetamina fue administrada después (post-tratados) de los ensayos a la caja de Skinner con el programa de reforzamiento de tasas bajas. Durante el desarrollo del experimento las ratas pre-tratadas con Anfetamina desarrollaron tolerancia y fueron capaces de obtener más reforzamiento, pero en las ratas post-tratadas la ejecución fue como si no hubieran tenido historia de administración de la droga, es decir este grupo no presentó tolerancia. Si la tolerancia mostrada por el primer grupo fuera el resultado de los cambios metabólicos y fisiológicos entonces ésta se debería de haber presentado en ambos grupos; la explicación para esta diferencia es que las ratas aprendieron a modificar su conducta para compensarla por los cambios que causaba la droga.

La tolerancia también se puede explicar con el paradigma de condicionamiento clásico. El pionero en la investigación del desarrollo de la tolerancia condicionada fue Siegel (1975) con un estudio del desarrollo al efecto analgésico de la morfina. Siegel (1975) mostró, que las ratas sólo presentaban tolerancia al efecto analgésico de la morfina si las pruebas de analgesia se hacían en el mismo lugar donde habían sido inyectadas con morfina en repetidas ocasiones. A los animales que se les dio morfina en el cuarto normal de alojamiento y que fueron probadas en un cuarto diferente, mostraron latencias similares a la de los animales que nunca recibieron morfina. La tolerancia a la morfina fue dependiente del ambiente en la cual había sido administrada la droga. Estos resultados muestran dos aspectos importantes, por un lado la teoría pavloviana de Siegel, plantea que la tolerancia se debe al desarrollo de una reacción compensatoria condicionada que neutraliza los efectos incondicionados de la droga. Y por otro lado, que el

contexto donde se hicieron las administraciones de la morfina se conforma de estímulos o señales, las cuales se condicionaron durante la asociación contexto-droga, de tal forma que cuando la droga se administra en el mismo contexto éstas producen una reacción compensatoria. La mayoría de las investigaciones sobre condicionamiento farmacológico han sido influenciadas por la teoría de Pavlov de la formación de la RC. De acuerdo a esta teoría, la RC es una réplica de la RI, y los trabajos de condicionamiento de drogas han demostrado que la RC minimiza el efecto de la droga (Siegel, 1975). En contraste, en 1973 Subkov y Zilov reportaron que los perros con historia de administración de adrenalina (cada inyección inducía una respuesta de taquicardia), mostraban una respuesta condicionada de bradicardia. Otras investigaciones muestran otros ejemplos de la RCC en animales. Por ejemplo, en adicción al efecto de bradicardia, la adrenalina también decreta la secreción gástrica e induce hiperglicemia. En algunas drogas, la RC es una compensación anticipatoria de algunos efectos de la droga; las señales ambientales asociadas a la droga provocan respuestas que son opuestas al efecto de la droga. Por ejemplo, el sujeto con historia de administración de morfina (analgésico) frecuentemente muestra una RC de hiperalgesia (Krank, Hinson & Siegel, 1981; Siegel, 1987). También se han reportado RCC con respecto a la respuesta térmica (Siegel, 1978), locomotora (Paleta & Wagner, 1986), y sedación de los efectos de la morfina (Hinson & Siegel, 1983).

Tolerancia Cruzada

Se refiere al decremento en la respuesta a una droga como consecuencia de tratamientos previos con otras drogas y se presenta con drogas de la misma clase o que tienen efectos similares (Thompson & Boren 1983; Le, Khanna & Kalant, 1987).

1.3 Tolerancia por forma de administración

a) Tolerancia Aguda

Esta se observa durante el transcurso de una sola exposición a la droga y se desarrolla muy rápidamente; el grado de tolerancia aguda es mayor a medida que aumenta la duración de la exposición a la droga (LeBlanc, Kalant & Gibbens, 1975).

b) Tolerancia Crónica

Se produce por un tratamiento prolongado del fármaco, generalmente por días o semanas, y regularmente se acompaña de tolerancia disposicional. La tolerancia crónica es la más compleja porque varios procesos conductuales pueden afectar su desarrollo. Cabe señalar que además de la forma de desarrollo de la tolerancia, la cantidad dada del fármaco y la duración de exposición son importantes (Le, Mihic & Wu, 1992).

1.4 Medidas de tolerancia

Como la tolerancia puede ser cuantificada como un desplazamiento hacia la derecha de la curva semilogarítmica dosis-respuesta, cualquier método que cuantifique confiablemente la respuesta sería adecuado. Pero en la práctica la cuantificación se ve limitada por:

- a) La naturaleza de la droga
- b) Una droga provoca varios efectos y la tolerancia puede ser desarrollada a uno o a todos los efectos.
- c) La tolerancia no se desarrolla en igual medida a todas las acciones de una misma droga.
- d) La sensibilidad del procedimiento de prueba permite observar variaciones en la velocidad y grado de desarrollo de la tolerancia (Fernández, Kluwe & Cooper, 1977).

Para superar estas limitaciones se han empleado medidas fisiológicas y/o conductuales. Así, cuando una droga induce en el organismo una serie de cambios, se han tomado medidas fisiológicas gruesas como un cambio en la dosis letal 50 (DL50), o medidas más sensibles como los cambios en la frecuencia espontánea en el electroencefalograma, cambios en el umbral de las convulsiones inducidas por choques, cambios en la temperatura del cuerpo, cambios en la latencia del reflejo de enderezamiento, etc., dependiendo de los efectos que produce una droga en particular. Cuando se han empleado medidas conductuales se evalúan los cambios en la ejecución motora en los procesos de discriminación, elección, etc. (Cornfield-Summer & Stolerman, 1978). Se puede decir que el método de cuantificación de la tolerancia elegido depende del efecto de interés y del tipo de droga. Además, otros investigadores sugieren que un buen método es aquel que produce medidas que son sensibles a pequeños incrementos de dosis de droga, reproducibles y

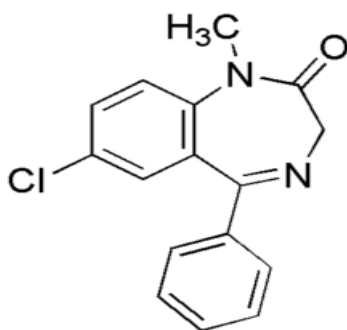
estables, que permitan la identificación y análisis de los componentes de la respuesta afectada por la droga y que evalúan una variable continua más que una discreta (Kalant, et al., 1971).

De acuerdo a lo anterior, en el desarrollo de la tolerancia intervienen varios factores tanto farmacológicos como conductuales que pueden explicar los mecanismos que dan lugar a la presencia o ausencia de la tolerancia, por lo que es importante considerar estos dos procesos para un mayor entendimiento del fenómeno de la tolerancia.

Entre las drogas que desarrollan tolerancia y que se prescriben con mayor frecuencia son las benzodiazepinas. A continuación se describen sus características.

2. Benzodiazepinas

El término benzodiazepina se refiere a la parte de la estructura, que se compone por un anillo benceno fusionado con un anillo de diazepina de siete miembros, contienen un sustituto 5-aril (anillo) y un anillo 1,4-diazepina, el cual se refiere a las 5-aril-1,4 benzodiazepinas. Modificaciones en las estructuras de los sistemas de anillos producen compuestos con actividades similares.



Estructura química del diazepam

(7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona)

Los primeros compuestos que se utilizaron en la investigación de agentes químicos para aliviar el estrés, la tensión, la ansiedad, y la disforia, fueron los sedantes como el etanol y posteriormente los barbitúricos. Debido a que los barbitúricos desarrollaban tolerancia y dependencia, además de tener un margen de seguridad bajo, se disminuyó su uso. Posteriormente la ansiedad se trató con las benzodiazepinas: clordiazepóxido, diazepam, oxazepam, clorazepato, lorazepam, prazepam, alprazolam, halazepam y clonazepam y se prescriben también para problemas en el dormir y como relajante muscular, pero tienen efectos adversos como la inducción de sedación (O'Brien, 1996).

2.1 Propiedades Farmacológicas

Todos los efectos de las benzodiazepinas se producen por acciones de estos fármacos en el SNC. Los más importantes son sedación, hipnosis, disminución de la ansiedad, relajación muscular, amnesia anterógrada, actividad anticonvulsiva y bloqueo neuromuscular, que ocurre sólo con dosis altas (Sanger, Jol & Perrault, 1995). En algunos estudios, tanto la sedación como la amnesia, se observan a dosis similares; pero se ha reportado que el

deterioro del aprendizaje puede presentarse por dosis de benzodiazepinas que no dan origen al deterioro psicomotor y sedación (McNamara & Shelton, 1997).

Las benzodiazepinas se han clasificado por la acción de sus efectos como: agonistas completos, es decir que imitan las acciones de agentes como el diazepam, la ocupación de sus sitios de unión es relativamente baja; también como agonistas parciales, los cuales producen menos efectos o requieren una ocupación relativamente alta en comparación con agentes como el diazepam. Algunos compuestos tienen efectos opuestos a los del diazepam y se les denominan agonistas inversos, se reconocen también agonistas inversos parciales, estos no poseen una eficacia completa (Cole, Hilman, Seidelmann, Klewer & Jones, 1995). Los agonistas parciales y los agonistas inversos parciales no son capaces de producir una activación máxima de los receptores a las benzodiazepinas, y por lo tanto no generan todos los efectos conductuales que producen los agonistas completos. Los efectos se pueden revertir o prevenir por el antagonista flumazenil, el cual inhibe los efectos de agonistas benzodiazepínicos compitiendo por el sitio receptor en el sistema nervioso central (Kasson, 1992), el flumazenil puede reducir o terminar los efectos de la benzodiazepina dependiendo de la dosis (Karavokiros, Tsipis, Suarez & Demers, 1990) y compite por la ocupación de los receptores de las benzodiazepinas (Enna, & Bowery, 1997). Otros compuestos se comportan como el flumazenil, y bloquean los efectos de los agonistas completos o de los agonistas parciales o de los agonistas inversos (Julien, 1998; O'Brien, 1996).

Se ha observado que las benzodiazepinas afectan la actividad de las neuronas del SNC, estas drogas no son depresores neuronales como los barbitúricos; y aunque tienen perfiles farmacológicos muy parecidos, difieren en su selectividad y, por lo tanto, varía el grado de utilidad clínica de cada uno. A medida que se aumenta la dosis de una benzodiazepina, la sedación progresa hasta producir hipnosis seguida de estupor, no producen anestesia general verdadera, ya que persiste la percepción del paciente (Hobbs, Rall & Verdoom, 1998).

2.2 Absorción y Distribución

Todas las benzodiazepinas se absorben por completo, con excepción del clorazepato que sufre un metabolismo ulterior. Los fármacos activos a nivel del receptor de las benzodiazepinas se pueden clasificar en tres categorías, según su vida media: 1) agentes de acción breve con una vida media menor de 6 horas, como el triazolam, el midazolam cuya vida media es de 1.5 a 2.5 horas y la zopiclona (con una vida media de cinco a seis horas); 2) agentes de acción intermedia con una vida media de 6 a 24 h, entre ellos, el estazolam y temazepam, y 3) agentes de acción prolongada con una vida media mayor de 24 h, entre ellos se encuentran, el flurazepam, el quazepam, y el diazepam cuya vida media es de 20-50 horas (Brailowsky, 1995).

Las benzodiazepinas y sus metabolitos activos se fijan en proteínas plasmáticas. El grado de la fijación se relaciona con su solubilidad en lípidos, y varía 70% en el caso del alprazolam y casi el 99% en el diazepam. La redistribución es más rápida para los fármacos con la solubilidad más alta en lípidos.

Cabe mencionar que las benzodiazepinas facilitan la neurotransmisión mediada por el GABA, específicamente por los receptores GABA_a, que tienen un sitio de reconocimiento a las benzodiazepinas. Al ocupar sus receptores se produce la apertura de canales de iones permeables al cloro. Cuando el cloro entra a la célula, el interior de ésta se vuelve más negativo, disminuyendo su excitabilidad. En otras palabras, el GABA inhibe la neurona (disminuyendo la probabilidad de que ésta se excite). Lo que hacen las benzodiazepinas es aumentar la frecuencia de la apertura de estos canales de iones sensibles al cloro, es decir potencian la acción del GABA (Brailowsky, 1995).

2.3 GABA

El ácido Gamma- amino butírico (GABA) es cuantitativamente el transmisor inhibitorio en el SNC más importante. Las neuronas que contienen GABA están distribuidas en el SNC, el GABA controla el estado de excitabilidad en todas las áreas del cerebro, y el nivel de actividad neuronal es regulado por el balance entre el suministro excitatorio (comúnmente glutamatérgico) y la

actividad inhibitoria GABAérgica. Si el balance se mueve a favor del GABA, entonces aparece la sedación, amnesia y ataxia. Por otro lado, la leve atenuación del sistema GABAérgico resulta en excitación, ansiedad, agitación insomnio y reactividad exagerada (Nutt & Malizia, 2001).

2.3.1 Bioquímica del GABA

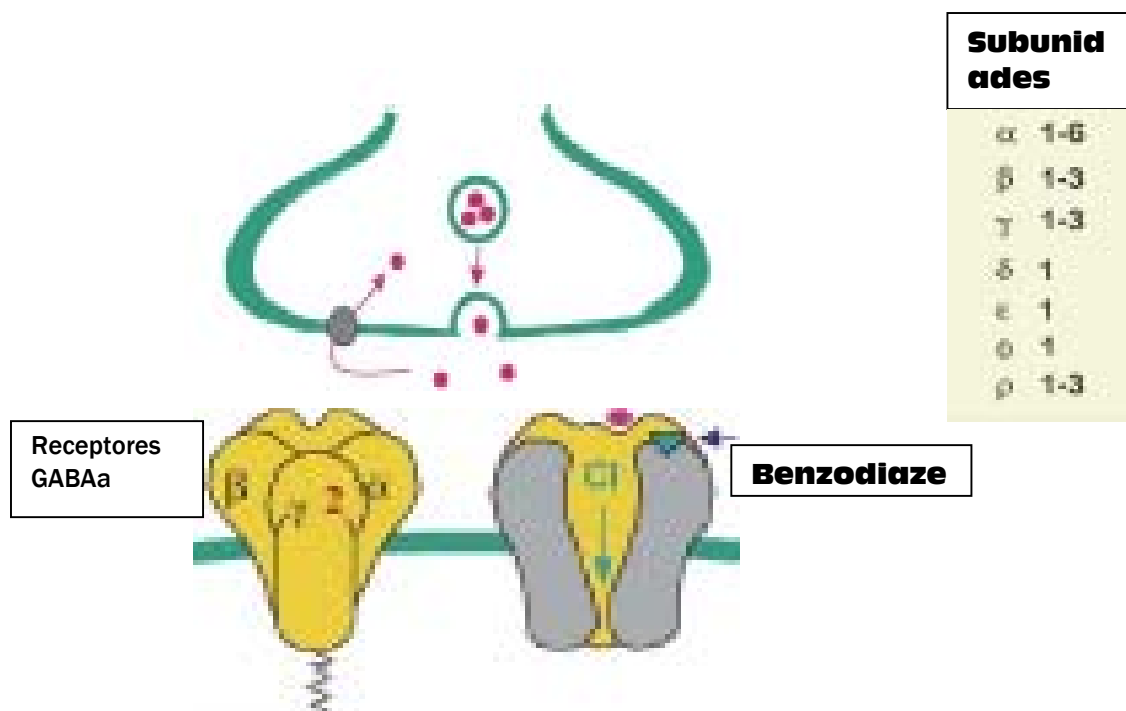
El GABA es metabolizado por la vía de la descarboxilación del glutamato, en la cual dos enzimas juegan un papel central. La enzima descarboxilasa de glutamato o GAD cataliza la descarboxilación del L-glutamato a GABA. El GABA es convertido por la enzima GABA aminotransferasa a semialdehído succínico, el cual es oxidado a succinato. Dos isoformas de la enzima glutamato descarboxilasa son codificadas por dos genes diferentes conocidas como GAD65 y GAD67 que son expresadas en las neuronas GABAérgicas.

Los cambios alostéricos (cambio de la conformación del sitio de unión a un sitio diferente) de la unión de la benzodiazepina al receptor incrementan la eficacia del GABA, habilitando así los circuitos para producir un efecto inhibitorio más largo. La acción de otras drogas como los barbitúricos, y etanol, pueden también abrir directamente el canal del cloro. Las benzodiazepinas son seguras, porque los circuitos vitales del cerebro no pueden ser inhibidos por arriba del nivel que podrían lograrse por efectos naturales GABAérgicos (Nutt & Malizia, 2001).

2.3.2 Receptores

Se han identificado tres grandes grupos de receptores: los receptores GABA_a, los receptores GABA_b y GABA_c. El receptor GABA_a es una proteína penta transmembranal que incluye dentro de su estructura molecular, canales de cloro (Cl⁻) que se abren después de la liberación del GABA desde las neuronas presinápticas (Schmitt, Luddens & Hiemke, 2001).

A través de la purificación, secuenciación y clonación del receptor GABA_a se han identificado 17 subunidades arregladas en 7 familias (α 1- α 6, β 1- β 3, γ 1- γ 3, σ , ϵ , π , y θ).



Arquitectura molecular de una sinapsis Gabaérgica con el repertorio de las subunidades de los receptores GABA_a. Möhler et al. (2004).

La expresión de la recombinación de receptores muestran que al menos una subunidad α , una β , y una γ , una σ o una ϵ se requieren para formar un pentámero (ver Carling et al., 2005). Estos subtipos de receptores se encuentran distribuidos en el cerebro, sugiriendo que diferentes combinaciones de las subunidades desempeñan diferentes funciones y muestran diferentes características basados en sus respuestas a varios ligandos (ver Wafford, 2005). Se cree que los receptores que contienen una subunidad γ_2 posee un sitio de unión para las benzodiazepinas. Los sitios de unión para GABA y BZ se localizan entre las subunidades α/β y α/γ . La importancia de la heterogeneidad de los receptores GABA_a es que las diferentes combinaciones de las subunidades tienen diferentes funciones relacionadas a los efectos de las benzodiazepinas (anticonvulsivos, ansiolíticos, amnésicos, sedantes, deterioro en la actividad motora, tolerancia y dependencia (ver Cruz & Cedillo, 2008).

La expresión del receptor GABA_a es extensa en el cerebro, sistema nervioso y en el RNA_m del receptor GABA_a en la glía. Los receptores GABA_a tienen diferentes sitios de reconocimiento a: muscimol (agonista) y bicuculina

(antagonista) GABA, a las benzodiazepinas, a los barbitúricos, a los neuroestroides, sitio a la picrotoxina, sitio ion de Cl^- , y el sitio al Zn^{2+} (Klein & Harris, 1996), sitio a los anestésicos volátiles y el etanol, y al flumazenil (Enna & Bowery, 1997).

Las proteínas de los receptores GABA_a , han sido bien caracterizadas por su alta abundancia y el papel que juega en los circuitos neuronales. Basándose en una secuencia homóloga de la primera subunidad del receptor GABA_a de cadenas de ADN, se pudieron clonar otras subunidades. La combinación de subunidades homólogas forman tres clases: α , β y γ , en mayor abundancia y otros dos tipos σ y ρ que han sido identificados en ciertos tipos de neuronas. Y como ya se mencionó cada subunidad en el cerebro está expresada independientemente en varias isoformas (Möhler, Benke, Benson, Lüscher, Rudolph & Fritschy, 1997). Cuando dos moléculas de GABA se unen al receptor GABA_a , ocurre un cambio conformacional que causa la apertura del canal de cloro, cuando las benzodiazepinas se unen al receptor GABA_a , la capacidad de GABA para abrir el canal de cloro- es mejorada y quizá se deba a un cambio conformacional del canal del ión de la forma de abrir y cerrar, incrementando la frecuencia de la apertura del canal del cloro facilitando la inhibición neuronal (Hutchinson et al., 1996). Al parecer todos los receptores benzodiazepínicos/ GABA_a contienen subunidades β , el 75% contiene subunidades γ_2 y el 20-30% contiene subunidades σ , por lo que la localización de expresión de la subunidad es importante para especificar funciones del cerebro y enfermedades (Klein & Harris, 1996).

Se ha demostrado que el acoplamiento del receptor GABA_a no es azaroso, ya que cuando células L929 de ratón fueron manipuladas con subunidades α_1 -, β_1 - y γ_2 , una población de receptores $\alpha_1 \beta_1$ y γ_2 , fue expresada (ver revisión de Klein & Harris, 1996).

Los subtipos de receptores GABA_a que tienen afinidad por las benzodiazepinas están formados por la combinación de las subunidades α_6 , β_3 , γ_3 y σ_2 (Schmitt et al., 2001). Los receptores a benzodiazepinas son activados por fármacos agonistas como el clordiazépoxico, diazepam, flunitrazepam, triazolam, alprazolam, clonazepam, midazolam entre otras que son utilizados ampliamente en la clínica.

La desensibilización de los receptores GABA_a por la exposición al agonista ocurre en segundos y después de quitar el agonista se revierte en minutos, el tratamiento crónico del cultivo primario neuronal con agonistas GABA produce una baja regulación de los receptores GABA_a, en ratas y ratones; la magnitud de la baja regulación inducida por el agonista de los receptores GABA_a es hasta un 40% en los sitios de unión a las benzodiazepinas, que ocurre de 2 a 3 días de tratamiento y una característica consistente del tratamiento crónico con un agonista, es el no acoplamiento de GABA y los sitios de unión benzodiazepínico en el complejo del receptor (ver revisión de Klein & Harris, 1996).

La exposición crónica de los receptores GABA_a con agonistas GABA o moduladores alóstericos como las benzodiazepinas alteran la función de estos receptores, cuestionando el mecanismo responsable de estos cambios, por lo que se planteó que el uso de células cultivadas pueden usarse para conocer alguno de los mecanismos, uno es la substitución de la subunidad, otro es el reciclaje/internalización del receptor y el último es la fosforilización del receptor. La substitución de subunidad puede no ocurrir en algunas células transfectadas, por lo que queda fuera como mecanismo responsable para los efectos crónicos, más bien provee cambios lentos en la función del receptor GABA_a como la expresión del gene la cual ocurre primero en el núcleo, la proteína es sintetizada y transportada a la membrana de la célula y finalmente los nuevos receptores deben insertarse en la membrana de los receptores “viejos” que son internalizados por lo que los nuevos receptores dominan en número (Klein & Harris, 1996), concluyen con base en su revisión que los tratamientos crónicos de drogas regulan el acoplamiento alósterico y la función de los receptores GABA_a en células manipuladas estables. Esta regulación parece que no se debe al decremento en la expresión de las subunidades del receptor $\alpha 1$ o $\beta 1$ del receptor o a la expresión de otras subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 2L$. La rápida regulación del acoplamiento alósterico y función por el tratamiento de la droga de las células manipuladas pueden proveer alguna comprensión de los mecanismos del acoplamiento entre los receptores GABA_a y las benzodiazepinas, así como de tolerancia a las benzodiazepinas.

Los receptores GABA_b se definen con base a la insensibilidad a la bicuculina y su afinidad por el baclofen (BA), considerado como el agonista

prototipo GABA_b. El BA induce una hiperpolarización e incrementa la conductancia en la membrana, mediando esta acción a través de las proteínas G. Los receptores GABA_b están acoplados al canal de calcio (Ca) y de potasio (K) vía proteína G y a un sistema de segundos mensajeros. Los receptores GABA_b existen en las neuronas en sus partes post y presinápticas, y como resultado de su activación se presenta primero, un decremento en la liberación del neurotransmisor en las terminales nerviosas, que puede ser inducido por un decremento en la conductancia del Ca⁺⁺ y/o en un incremento en la conductancia del K⁺; segundo, una hiperpolarización de la membrana causada por un incremento en la conductancia del K⁺. Estudios electrofisiológicos para el estudio de los receptores GABA_b post y presinápticos indican que existen diferencias entre estos receptores (Möhler et al., 1997).

Los receptores GABA_c están asociados a los canales de Cl⁻ cuya activación es inhibida por PX ó zinc (Zn), sin embargo los receptores GABA_c son insensibles a la bicuculina y a los moduladores GABA_a (barbitúricos, benzodiazepinas y neuroesteroides). Estos canales de receptores GABA_c, aparentan estar compuestos por subunidades rho 1, 2 y 3 y se han identificado en rata y en humanos en proporciones del 63% y 61% en subunidades rho1 y rho 2, respectivamente (Möhler et al., 1997).

Asimismo, los receptores sensibles a las benzodiazepinas están determinados por la presencia de subunidades α ($\alpha 1 - \alpha 5$), estos receptores que activan a las subunidades $\alpha 1$ se han relacionado con los efectos sedantes de las benzodiazepinas, mientras los que contienen $\alpha 1 \alpha 3$ se les relaciona con los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas (Iversen, 2004). Los agonistas completos de los receptores de las benzodiazepinas (ω) producen efectos diferentes a diferentes dosis: dosis bajas se asocian con efectos antiansiedad y anticonvulsivos y dosis altas se asocian con efectos de sedación y relajación muscular, estos efectos se relacionan con el incremento de los niveles de ocupación de receptores y su activación, lo que plantea la posibilidad de que las drogas con propiedades agonistas parciales tendrían más ventajas clínicas (Sanger et al., 1994). Algunos estudios sugieren que los receptores de las benzodiazepinas₁ ($\omega 1$) pueden mediar los efectos ansiolíticos, por ejemplo en pruebas de actividad exploratoria en el laberinto

elevado en cruz (LEC) no todas las drogas producen efectos similares; el alpidem y el bretazenil (agonistas parciales del receptor α a las benzodiazepinas (ω) producen un incremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (ver revisión de Sanger et al., 1994).

Un antagonista específico de las benzodiazepinas es el flumazenil (Ro 15-1788) que reconoce a los receptores de benzodiazepinas constituidos por las combinaciones de subunidades que incluyen a α (1, 2, 3, 5) y (β x y) o a las combinaciones, el cual compite por la ocupación de los sitios de unión en el receptor GABA, desplazando la benzodiazepina de su receptor (Schmitt et al., 2001).

2.4. Tolerancia de las benzodiazepinas

El uso crónico de las benzodiazepinas para el tratamiento de ansiedad produce tolerancia y dependencia. Estudios en animales sugieren que la tolerancia observada con benzodiazepinas es de naturaleza farmacodinámica, ya que no hay evidencia que sugiera un cambio significativo en el metabolismo de las benzodiazepinas, en la concentración en plasma, o en su rango de metabolitos sobre el tiempo. Por lo que la tolerancia farmacodinámica, se ha conceptualizado como el proceso por el cual los receptores a la droga en el cerebro se adaptan o compensan por la presencia continua de la droga (Le, Mihic & Hu, 1992). Por ejemplo, el inhibidor de unión al diazepam (DBI) que es un polipéptido, es capaz de reducir la actividad del receptor GABA_A por el enlace al sitio de unión de la benzodiazepina sugiriendo que en las ratas tolerantes al diazepam, la biosíntesis del DBI es hiperregulada, lo que podría tal vez explicar el desarrollo de la tolerancia. En cambio, cuando los receptores se adaptan a la presencia de la droga y si el tratamiento de la droga es finalizado, podría ocurrir una actividad neuronal anormal, lo cual causa los síntomas de abstinencia que son indicativos del fenómeno de dependencia. Esta describe un tipo de tolerancia que se origina de algunos ajustes que hace el organismo para compensar el efecto de la presencia continua de la droga.

El desarrollo de la tolerancia no es un proceso unitario, la tolerancia a diferentes efectos conductuales de las benzodiazepinas se desarrolla a diferentes tasas y a diferentes extensiones (ver revisión de Hutchinson, et al.,

1996) y esto podría estar relacionado al hallazgo de que hay un número de subtipos del receptor GABA_a, que están distribuidos diferencialmente en el SNC, que podrían adaptarse a la presencia de las benzodiazepinas a diferentes tasas.

Recientemente, la información de la estructura molecular del sitio de unión de las benzodiazepinas y el desarrollo de la capacidad para diferenciar los subtipos del receptor GABA_a, por manipulación genética, ha comenzado a facilitar el entendimiento del mecanismo de la tolerancia y dependencia de las benzodiazepinas (Biggio et al., 2003).

En 1987 la primera subunidad del receptor GABA_a fue aislada, secuenciada y mostrada como parte de los ligandos de canales de iones (Schofield, et al., 1987). El descubrimiento de que la familia de los receptores GABA_a tienen un papel funcional, da la oportunidad para continuar con el análisis de las benzodiazepinas y separar los efectos ansiolíticos de los efectos colaterales a través del aislamiento farmacológico de los subtipos (Wafford, 2005).

La exposición crónica a las benzodiazepinas trae como consecuencia alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica. Estas alteraciones contribuyen a los síntomas de tolerancia, dependencia y abstinencia. La naturaleza y los mecanismos de estos cambios no son claros, sin embargo, están relacionados a la dosis y duración del uso de la benzodiazepina (Allison & Pratt, 2003). Los resultados son consistentes con la observación de la reducción en la potenciación de la respuesta del GABA por la aplicación aguda de las benzodiazepinas posterior a la exposición crónica de éstas, por lo que los receptores estimulados crónicamente son menos sensibles a un cambio agudo.

Otro efecto del tratamiento crónico con benzodiazepinas, es que provoca alteraciones en la expresión individual de los subtipos de receptores. Por ejemplo, en investigaciones de los niveles de proteína del receptor se ha encontrado un decremento en el α y una gran regulación de $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2/3$ y subunidades $\gamma 2$ después de 2 semanas de tratamiento con diazepam el cual reduce la inhibición sináptica en el hipocampo (Pesold et al., 1997).

Asimismo, la ocupación prolongada de los receptores GABA_a por agonistas y drogas que facilitan la acción del GABA llevan a la regulación de cambios que generalmente resultan en una disminución de los niveles del receptor y de su función. Por lo que el tratamiento prolongado con benzodiazepinas (Friedman, Gibbs & Farb, 1996; Gallager, Lakoski, Gonsalves & Rauch, 1984) induce un acoplamiento alostérico del GABA y de los sitios de unión de las benzodiazepinas, que se caracteriza por un decremento en el GABA, resultado de los cambios de regulación del nivel de receptores aumentando la unión benzodiazepínica. Por otro lado, se ha reportado (que una baja regulación de los receptores benzodiazepínicos ocurre paralelamente con el desarrollo de tolerancia a los efectos farmacológicos de las benzodiazepinas, pero esto no siempre ocurre, también se han reportado cambios en la sensibilidad o función del receptor GABA tras la administración crónica de benzodiazepinas (Sanger et al., 1994). También, se reporta ausencia de tolerancia por la administración crónica del agonista parcial (bretazenil) a pesar de que ocupa una alta proporción de receptores benzodiazepínicos (ω), probablemente debido a que esta droga produce bajaregulación de receptores (Miller, Galpern, Greenblatt, Lumpkin & Shade, 1990).

De igual forma, en ratas y ratones la presencia continua de benzodiazepinas provoca cambios tanto en la unión de ligandos como en las propiedades de los receptores GABA_a (Cash, Serfozo & Allan, 1997). Sin embargo, diferentes subunidades α median la distinta acción farmacológica de las benzodiazepinas, incluyendo los efectos sedantes-hipnóticos (Griebel et al., 2003), ansiolíticos y relajantes.

Diferentes estudios (Follesa et al., 2000, 2001) han mostrado que administraciones a largo plazo de las benzodiazepinas modifican la expresión de los genes que codifican varias subunidades del receptor GABA_a. Tales cambios en la expresión del gene podrían alterar la sensibilidad de los receptores del GABA_a a sus moduladores farmacológicos y de este modo subrayan el desarrollo de tolerancia y/o dependencia de éstas drogas. Así, las benzodiazepinas clásicas no muestran afinidad por los receptores GABA_a que contienen subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$, aunque el antagonista benzodiazepínico

flumazenil muestra un perfil agonista a los receptores GABA_a que contienen algunas de estas subunidades (Biggio et al., 2003).

Estudios in vivo e in vitro (Holt, Bateson & Martin, 1996; Holt, Martin & Bateson, 1997) muestran que la suspensión de drogas que fueron administradas crónicamente, produce cambios específicos en la expresión del gene de diferentes isomorfismos alfa, y de cambios paralelos en la función del receptor GABA_a. Estos datos sugieren que los cambios en la plasticidad de los receptores GABA_a durante las condiciones farmacológicas pueden alterar la actividad específica de las poblaciones neuronales donde se localizan tales receptores. De acuerdo a esto, los cambios en la plasticidad del receptor GABA_a están asociados con diferentes cambios paralelos en la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas mesocorticales a la acción de las benzodiazepinas, etanol y neuroesteroides (Dazzi et al., 2002).

Gallager, Lakoski, Gonsalves & Rauch, (1984) demostraron que administrando diazepam a ratas por dos períodos y midiendo la unión de la benzodiazepina en la corteza, se observa un decremento del 50% de la unión de GABA a la benzodiazepina en las ratas tratadas con diazepam, pero no se observan cambios en la afinidad o densidad de receptores. Asimismo, la exposición de 2 a 4 semanas con benzodiazepinas causa un decremento en los niveles de la subunidad alfa1 en el RNAm en la corteza de la rata de un 25% y en el ratón de un 50%.

Un estudio de Biggio et al. (2003) diseñado para conocer los mecanismos moleculares entre la tolerancia y la dependencia provocadas por la administración intraperitoneal de etanol (0.25 g/kg) y finasteride (25 mg/kg), demostraron que la selectividad y la actividad intrínseca de éstas drogas es importante para dar evidencia del nivel molecular del receptor del GABA_a a la tolerancia. Se sugiere que las drogas probadas son potencialmente iguales para inducir dependencia. Los resultados mostraron que tanto la exposición a largo plazo como la suspensión de esteroides endógenos, benzodiazepinas y etanol provocan marcados efectos en la estructura y función de los receptores GABA_a.

Se sugiere una acción sinérgica entre los esteroides endógenos y estas drogas en la modulación de la actividad funcional de las poblaciones

neuronales específicas. Como ya se mencionó, si se administran benzodiazepinas durante periodos prolongados y se suspende su administración repentinamente, pueden observarse síntomas graves de abstinencia que en ocasiones incluyen convulsiones. En las benzodiazepinas con vida media larga, los síntomas de abstinencia después de tratamientos crónicos pueden no observarse después de una semana de la retirada repentina del fármaco, y si se manifiestan serán leves (O' Brien, 1996). La administración de benzodiazepinas potentes de acción corta se puede acompañar de la aparición de síntomas de ansiedad entre las administraciones de las dosis, por lo que es difícil interrumpir el tratamiento.

El grado de desarrollo de la tolerancia depende en particular del efecto, del tipo de benzodiazepina usada, la dosis, tipo de tratamiento y ruta de administración. Se ha reportado (Rosenberg, 1995) que las benzodiazepinas no interactúan uniformemente con sus receptores y por lo general, bastarían tres semanas de inyecciones de diazepam (5 mg/kg) diarias para observar la tolerancia en pruebas de ansiedad en animales.

Las benzodiazepinas son de las drogas que se usan más en el tratamiento de desordenes de ansiedad en humanos, y son de menor riesgo que los hipnóticos, barbitúricos (O'Brien, 1996). La evidencia del desarrollo de tolerancia es clara en el efecto relajante muscular, en los efectos atáxicos, locomotor y anticonvulsivo después de administraciones crónicas de dos a tres semanas (File, 1985b). También la tolerancia se observa a los efectos sedantes del alprazolam, clonazepam, lorazepam, efectos motores del flurozepam, y el efecto anticonvulsivo del diazepam (File, Baldwin & Hitchcott, 1989; Ramsey-Williams, Wu & Rosenberg, 1994).

Otro parámetro relevante a evaluar en ésta investigación, es comparar los efectos de las benzodiazepinas de acción corta y acción larga como midazolam y diazepam respectivamente

En los compuestos de acción larga como el diazepam el desarrollo de tolerancia es más lento ya que estos compuestos son biotransformados en metabolitos farmacológicamente activos. Las benzodiazepinas de acción larga son así porque su actividad ansiolítica es provocada no sólo por la droga original, sino también por la actividad farmacológica del metabolito nordiazepam de vida media larga. Las benzodiazepinas de acción corta como

el midazolam son metabolizadas directamente en productos inactivos. Es importante señalar para este estudio, la diferencia en el tipo de tratamiento agudo y crónico de las dos benzodiazepinas en el desarrollo de la tolerancia a sus efectos ansiolíticos, ya que los resultados de los estudios en este tipo de tratamiento han mostrado diferencias en cuanto al desarrollo de la tolerancia en estos procedimientos. Por ejemplo en un estudio de Ellinwood et al., (1987) reportaron un desarrollo significativo de tolerancia aguda durante las primeras horas después de una sola dosis de diazepam, en tanto que no se encontró tolerancia aguda después del tratamiento agudo con lorazepam. Esto indicaría que la presencia de la tolerancia aguda depende de la dosis administrada o del efecto particular de la droga que está siendo probada (Ingum, Bjorklund, Voldem & Morland, 1994) y la frecuencia de las sesiones de prueba podría también influir en la presencia de la tolerancia aguda. Por otro lado, el midazolam que es una droga de acción corta es propenso a desarrollar más rápido tolerancia.

Varias benzodiazepinas pueden diferir con respecto a su habilidad para producir tolerancia aguda. Por ejemplo, Ellinwood et al., (1987) reportaron el desarrollo de la tolerancia aguda después del consumo de diazepam y alprazolam, mientras que no se observó tolerancia aguda después de la administración del lorazepam, esta ausencia aparente de tolerancia aguda después del lorazepam puede ser explicada por las propiedades farmacocinéticas de la droga.

Resumiendo, la exposición crónica a las benzodiazepinas trae como consecuencia alteraciones en el nivel de receptores y el grado de desarrollo de tolerancia depende en particular del efecto en la conducta, del tipo de benzodiazepina usada, la dosis, y el tipo de tratamiento.

2.5 Diazepam y Midazolam

Con relación al tipo de fármaco, en ésta investigación se estudian las benzodiazepinas (diazepam y midazolam), que son compuestos dominantes para el manejo de la ansiedad generalizada.

El midazolam es un compuesto de acción corta que posee la ventaja de ser más soluble en agua y menos irritante que otras benzodiazepinas inyectables, deprime al sistema nervioso central (SNC)

afectando las funciones del sistema límbico y subcortical del cerebro, se absorbe y actúa más rápido que el diazepam, el mecanismo de acción tanto del diazepam como del midazolam es que incrementan la acción del efecto de inhibición del GABA en las neuronas (Smith & Cedric, 1993). Por su vida media, la absorción del midazolam en el tejido muscular es rápida después de la administración, las concentraciones máximas se alcanzan a partir de los 15 minutos, se metaboliza completamente y sus metabolitos prácticamente carecen de efecto terapéutico ya que inmediatamente se conjugan con ácido glucorónico. Su vida media de eliminación es de 1.5 – 2.5 horas; y entre el 60% - 70% se elimina por vía renal, y el resto por el hígado. El 95% se une a las proteínas es por esta razón que atraviesa las barreras placentarias durante el embarazo (Smith & Cedric, 1993).

El diazepam es uno de los compuestos más prescritos para el alivio sintomático de la ansiedad, tensión y otros malestares asociados con desórdenes psiquiátricos. El diazepam ejerce efectos ansiolíticos sedantes, relajantes musculares y anticonvulsivos. El diazepam como el midazolam, deprime el sistema nervioso central (Hoobs, Rall & Verdoom, 1998).

La vida media del diazepam es de 30 horas porque es un medicamento de larga duración, se metaboliza a un metabolito farmacológicamente activo como N-desmetil-diazepam, que permite que el diazepam administrado por vía oral se absorba rápidamente, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas a los 30 – 90 min después de su ingestión. Los efectos secundarios comunes del diazepam son somnolencia, ataxia y fatiga, agitación, visión borrosa y confusión; también puede tener efectos tóxicos hepáticos y renales que se presentan en raras ocasiones. La administración crónica de diazepam produce dependencia física más comúnmente con dosis altas, pero ocurre también con dosis terapéuticas; por lo tanto la brusca suspensión del fármaco puede precipitar crisis como los estados epilépticos (McNamara & Shelton 1997); el consumo continuo de diazepam trae como consecuencia el desarrollo de tolerancia (Brailowsky, 1995).

A nivel farmacológico la tolerancia se mide por el cambio en el número de receptores específicos a una droga en el sistema nervioso central (SNC)

(Nutt & Malitzia, 2001), por la cuantificación de proteínas, expresión de genes. La tolerancia conductual se infiere por la disminución de los efectos de la droga en la conducta que puede ser medida en la latencia, frecuencia de la respuesta, etc. Se ha obtenido el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas en los efectos sedantes del alprozolam, clonazepam, lorazepam; efectos motores del flurazepam y efecto anticonvulsivo del diazepam (Rosenberg, 1995).

Se ha observado que el mayor problema de las benzodiazepinas en el uso terapéutico es el desarrollo de tolerancia, dependencia y el síndrome de abstinencia que sigue a la suspensión del tratamiento crónico (De Angelis, 1995). Los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas se acompañan de efectos colaterales indeseables que resultan de sus propiedades hipnótico-sedantes o de relajación muscular, también incluyen deterioro psicomotor y amnesia anterógrada (Suzuky, Uchiumi & Murasaki, 1995).

3. Ansiedad

La ansiedad tiene por lo menos dos características que la definen. Primero, es un estado emocional provocado por un estímulo perturbador, este estímulo que es el causante principal no precede ni acompaña al estado, sino que se anticipa al mismo. En la segunda característica se plantea el caso de cómo un estímulo que todavía no ocurre puede actuar como causa. Por ejemplo en el condicionamiento, cuando se aplica el estímulo choque eléctrico (E1) a un sujeto, este emite una respuesta de escape y si posteriormente se aparea con un estímulo neutro como un ruido (E2), después de varias asociaciones, el E2 induce en el sujeto una respuesta de escape por lo que el E2 (ruido), y no la ocurrencia futura del E1 (choque), es lo que produce la reacción. El aprendizaje adquirido es que el ruido provoca la respuesta de ansiedad por las presentaciones con el choque eléctrico (Estes & Skinner, 1941).

Ahora bien, la respuesta al estímulo estresor es un componente esencial de procesos adaptativos que son críticos para la sobrevivencia del organismo (Hajós-Korcsok et al., 2003), y se cree que las formas de adaptaciones al estrés podrían ser causa de trastornos afectivos tales como la ansiedad.

A nivel clínico, la ansiedad es “una enfermedad” que se acompaña de trastornos psiconeuróticos. Se plantea que la presencia de la ansiedad se debe a la sobreactividad de los sistemas adrenérgicos o de los sistemas serotoninérgicos en el SNC o a una leve atenuación del sistema GABAérgico, la ansiedad es consecuencia de alteraciones en el funcionamiento del receptor GABA_a y que estas pueden ser el resultado de los cambios en la concentración del GABA o del número de receptores, así como cambios en la sensibilidad del receptor, ya que como se mencionó los receptores GABA_a tienen un sitio de reconocimiento a las benzodiazepinas, (Clement & Chapoutier, 1998; Nutt & Malizia, 2001).

La evidencia de que los desordenes de ansiedad pueden ser causados por anomalías en los receptores de las benzodiazepinas se basa en una serie de estudios usando flumazenil, un antagonista de las benzodiazepinas (Nutt & Malizia (2001). Cuando se administraron 2 mg de flumazenil intravenosamente a pacientes con desorden de pánico, suficiente para ocupar

más de la mitad de los receptores en el cerebro, esto provocó pánico en los pacientes experimentales, pero no afectó a los sujetos control. Esto ha sido replicado en estudios (Strohle, Kellner & Holsboer, 1999; Woods, Katz & Winger, 1992), donde también se demostró que el desorden de pánico no se debe a las acciones de un agonista inverso, como en este caso donde el antagonista podría reducir la ansiedad, el efecto ansiogénico del flumazenil puede reflejar el desplazamiento de un agonista endógeno, pero esto sólo se puede presentar en pacientes experimentales (los controles no experimentan un incremento en la ansiedad). Otra hipótesis, es que el receptor de la benzodiazepina se mueve en dirección al agonista inverso, haciendo al flumazenil un débil agonista inverso, generando así ansiedad.

En cuanto a las estructuras que median las emociones como la ansiedad, se encuentran la amígdala que se piensa que es una estructura importante para la ansiedad. Las lesiones en la amígdala del hombre producen un efecto calmante, y la estimulación eléctrica de la amígdala en pacientes bajo los efectos de anestesia local provoca sentimientos de miedo y confusión (Sanders & Shekhar, 1995).

Además de la amígdala, el sustrato neuronal de la ansiedad lo constituyen el sistema septo-hipocampal, la sustancia gris periacueductal, los núcleo rafe y el colículo inferior (Graeff, Viana & Mora, 1997); apoyando lo anterior se ha encontrado que la estimulación del colículo inferior provoca reacciones de defensa (alerta), respuesta de congelamiento y respuestas de escape (Lamprea et al., 2002).

Para evaluar la ansiedad a nivel experimental con animales, específicamente con roedores, se han diseñado una gran variedad de modelos experimentales los cuales cumplen ciertos criterios. A continuación se citan algunos y se describe sólo el modelo del laberinto elevado en cruz que fue el que se utilizó en esta investigación.

3.1 Modelos de ansiedad

Los modelos de ansiedad en animales tratan de representar algunos aspectos de la etiología, sintomatología o tratamiento de los desórdenes de ansiedad en humanos para facilitar su estudio científico (Treit, 1985c). Uno de los propósitos de estos modelos es identificar nuevos compuestos ansiolíticos y

estudiar los mecanismos de estos compuestos en la producción de sus efectos ansiolíticos. Por lo que la validez predictiva y de constructo son importantes para el desarrollo de los modelos animales.

Asimismo, la validación de un modelo conductual debe reunir ciertos criterios como el que sea selectivamente sensible a los agentes ansiolíticos clásicos y a la dosis del compuesto, también que su potencia relativa como compuesto sea comparable a la potencia clínica y por último que sea selectiva a los efectos de un ansiolítico clásico. En el modelo animal la respuesta de ansiedad es de alguna forma similar a la respuesta de ansiedad humana (evitación) y en el modelo homólogo se plantea que la causa de la respuesta de la ansiedad en el animal es suficiente para causar una respuesta de ansiedad en humanos (Treit, 1985c).

Los criterios son importantes ya que es un requerimiento lógico que exista una similitud funcional entre el modelo animal y la ansiedad humana para estudiar los mecanismos de la acción ansiolítica de una droga; donde las reacciones de ansiedad en animales expresan un estado subjetivo que es similar a la experimentada por un humano ansioso. En los modelos de ansiedad animal se asume que la estimulación aversiva, real o anticipada, puede provocar conductas como la ansiedad tanto en humanos como en infrahumanos y ésta puede ser disminuida por agentes antiansiedad (Treit, Pesold & Rotzinger, 1993).

El miedo normal y la ansiedad son emociones que ayudan al organismo a evitar una gran variedad de peligros, estos estados emocionales negativos han sido conceptualizados como un repertorio típico de reacciones de defensa fisiológicas y conductuales características de la especie (Treit, 1985c).

En el humano, la ansiedad se refleja en el deterioro de respuestas de ejecución de evitación y escape, en el habla, en tareas de vigilancia. Esta ansiedad se parece a la que se genera con modelos donde se expone a los animales a ambientes nuevos. También se ha observado en la inhibición de la conducta exploratoria, en la respuesta de congelamiento, en el aumento en la toma de riesgo, en el incremento en la tasa cardíaca, en la defecación y micción. La homología entre animales y humanos puede ser apropiada cuando los modelos incluyen el contexto o situaciones ambientales que permitan evaluarlos en condiciones naturales.

1. Las pruebas disponibles de ansiedad se basan en las conductas condicionadas y conductas etológicas. Las primeras se basan en respuestas condicionadas como el miedo condicionado, congelamiento inducido por el miedo contextual o enterramiento defensivo condicionado. En estas pruebas los sujetos muestran miedo cuando se les prueba con señales o contextos asociados con experiencias aversivas como un contexto estresante. El segundo tipo de pruebas se basan en el miedo incondicionado de los roedores a choques eléctricos, a estímulos novedosos como un olor, una luz, etc., pruebas de interacción social, presencia de una luz fuerte (prueba de luz/obscuridad), espacios abiertos (laberinto en cruz o campo abierto), estas pruebas exploran los miedos naturales (Cruz-Morales, González-López, Gómez-Romero, Arriaga Ramírez, 2003; Leveleki et al., 2006; Sanger, Jolt & Perrault, 1995).

Los modelos tradicionales de ansiedad como el campo abierto o el laberinto elevado en cruz, están basados en la exploración de ambientes novedosos, los cuales pueden provocar reacciones defensivas y este ambiente puede ser peligroso para la sobrevivencia (Treit, 1985c).

Los modelos de respuesta incondicionada intentan una aproximación a las condiciones naturales bajo las cuales los estados emocionales son provocados, empleando estímulos aversivos no dañinos para inducir miedo y ansiedad.

3.1.1 Modelo del laberinto elevado en cruz (LEC)

Este modelo es considerado un procedimiento útil para evaluar la ansiedad y ha sido validado en ratas (Pellow, Chopin, File & Briley, 1985) y ratones (Lister, 1987). El LEC consiste de dos brazos abiertos y dos cerrados arreglados en forma de cruz y se encuentra elevado a 50 cm del piso, la prueba tiene una duración de 5 min y consiste en que el animal explora libremente los brazos abiertos del laberinto. En condiciones normales los roedores entran y pasan más tiempo en los brazos cerrados del laberinto, y en condiciones experimentales, las variables clásicas como el porcentaje de tiempo y número de entradas a los brazos abiertos que se consideran un índice de ansiedad, así como el número total de entradas, generalmente son afectadas por drogas que alteran la ansiedad, mientras que el número de entradas a brazos cerrados o

total de entradas son usados para medir la actividad motora. El criterio de que una droga tiene efectos específicos en las conductas de ansiedad en el LEC es que la actividad locomotora no se vea alterada por la droga (Kliethermes, 2005).

Sin embargo, aunque el LEC es el procedimiento más empleado para evaluar la ansiedad no es lo suficientemente sensible a los efectos de los ansiolíticos no benzodiazepínicos (Rodgers & Cole, 1994).

En un estudio de Ingum et al. (1994) evaluaron los efectos ansiolíticos del etanol en ratas en el LEC, para determinar su nivel de ansiedad inicial. Con base en su respuesta de autoadministración oral de etanol, los sujetos se clasificaron en dos grupos: ansiosos y no ansiosos. El primer grupo mostró una preferencia y alto consumo del etanol, comparado con el grupo no ansioso. En un segundo experimento a los sujetos se les inyectó etanol (0.5-1.5 g/kg, ip) mostrando efectos ansiolíticos dependiente de la dosis cuando se probaron en el laberinto en cruz. En ambos experimentos el nivel de etanol en sangre fue similar, lo que indica que las ratas consumen cantidades suficientes de etanol para observar los efectos ansiolíticos.

En un estudio de Zangrossi, Viana y Graeff (1999) se analizaron los parámetros tradicionales registrados en el laberinto en cruz por medio de un análisis factorial para confirmar la presencia de la ansiedad por reexposición al laberinto, la cual es cualitativamente diferente a la observada en la exposición inicial.

Las ventajas de este modelo es que es un aparato sensible para medir los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas, los sujetos no necesitan estar privados de agua y comida, la duración del ensayo es corta (5 min), no requiere de un entrenamiento previo al aparato, es muy sencillo su procedimiento y no necesita de aplicación de choques, su diseño es simple y económico, se puede usar en ratas hembras y machos, así como en ratones, se pueden evaluar los factores de ansiedad y actividad motora, además el registro adicional de respuestas etológicas permite un análisis más fino de las conductas del animal.

El LEC es una de las pruebas más populares usadas en animales y es frecuentemente usado para observar los efectos ansiolíticos de las drogas como las benzodiazepinas. Actualmente, su uso va en relación al

entendimiento de las bases biológicas de la emoción relacionada al aprendizaje y memoria, dolor, adicción, abstinencia y a varios subtipos de desordenes de ansiedad, como la ansiedad generalizada y fobia, así como definir las áreas del cerebro relacionadas al miedo/ansiedad. En esta investigación se eligió trabajar con el LEC por las ventajas ya mencionadas. También se le clasifica como un modelo de tipo incondicionado, lo que implica que la tarea por sí misma es aversiva, ya que los brazos abiertos provocan ansiedad. Asimismo, la prueba involucra la exploración espontánea de los roedores en ese ambiente y su metodología permite estudiar un patrón completo de la conducta del animal en la prueba de 5 min, así como analizar minuto a minuto el comportamiento del animal bajo los efectos de la droga o sin esta.

Se concluye que los modelos son herramientas útiles para evaluar conductas etológicas y condicionadas relacionadas con la ansiedad en los roedores (ratón y ratas), cada modelo reúne los criterios como procedimientos confiables para medir la ansiedad de estos animales, cada uno presenta ventajas y desventajas y su elección dependerá de la manipulación experimental y las características de la tarea a evaluar.

Como se mencionó, la tolerancia no solo puede ser explicada por mecanismos farmacológicos, si no también por mecanismos de aprendizaje, por lo que a continuación se describen aspectos importantes del papel del contexto en el desarrollo de la tolerancia.

4. Efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia condicionada.

Con base en los planteamientos de Balsam (1985) todo aprendizaje ocurre en un contexto de tipo asociativo. El contexto es definido por la localización del lugar, el tiempo y las características específicas donde se realiza la tarea. También es definido como el espacio físico donde se presentan los estímulos y una de sus funciones es modular la fuerza y tipo de control que ejerce el estímulo. Cuando el contexto es definido estructuralmente, se refiere a todos los aspectos de un ambiente experimental que se presentan simultáneamente con un estímulo condicionado e incluye las señales que permanecen constantes durante la sesión. Cuando el contexto se define por su función, significa que el contexto podría funcionar como modulador de la ejecución y el aprendizaje.

Algunas explicaciones del papel de las señales contextuales en el aprendizaje plantean que el contexto compite con señales por una fuerza asociativa (Rescorla & Wagner, 1972) o atención (Mackintosh, 1975), en estas teorías las señales y el contexto compiten entre si, esto es, que de una señal se aprende o atiende de lo que le ocurrirá a la otra.

Otra teoría la cual es básica para este estudio es el modelo de Pavlov, donde un estímulo neutral (EC) señala la presentación de un estímulo incondicionado (EI), este modelo permite estudiar cómo el organismo aprende a asociar estos dos estímulos. A nivel conductual permite explicar como una droga administrada ante un contexto, posteriormente éste provocará los efectos de la droga en ausencia de ésta.

Asimismo, la administración repetida de la droga ante el mismo contexto modulará el desarrollo de la tolerancia a la droga por la asociación previa de ambos eventos, para explicar esto se han planteado varias teorías asociativas que hacen referencia a la importancia del contexto.

Siegel (1975) propuso y demostró que factores asociativos subrayan la especificidad situacional de la tolerancia y que las manipulaciones asociativas como la extinción se aplican a la tolerancia de algunas drogas. Por lo que en términos asociativos la presencia o ausencia de la tolerancia a una droga

puede explicarse, si la droga es administrada y evaluada en el contexto de las señales asociadas a la administración del fármaco.

En muchos países, cada año mueren personas adictas a la heroína u otras drogas, supuestamente por sobredosis, pero muchos drogadictos mueren después de la administración de una dosis que podría no ser fatal, sugiriéndose que esto se debe a una pérdida de la tolerancia por administrarse la droga en un contexto diferente al de las asociaciones. Lo que indica un control contextual por parte de los estímulos asociados a la administración de la droga (Larson & Siegel, 1998).

Esto se demostró al obtener evidencia de la tolerancia condicionada específica al contexto evaluando los efectos atáxicos del alcohol usando un aparato de plano inclinado. Después del desarrollo de la tolerancia a la ataxia inducida por el alcohol, los autores introdujeron un nuevo estímulo (un ruido blanco y una luz incandescente) en el ambiente de prueba. El nuevo estímulo interrumpió la tolerancia en el grupo tratado con alcohol, sugiriendo que tal tolerancia fue condicionada a las señales presentes en el cuarto durante el periodo inicial de tratamiento. Resultados similares se observaron cuando el estímulo presente en el cuarto durante el desarrollo de tolerancia fue eliminado antes de la prueba (Larson & Siegel, 1998). Basada en la teoría de la "impresión" (*priming*) (Wagner, 1981), la teoría de la habituación explica el desarrollo de la tolerancia con base en el valor sorpresivo que tiene el estímulo (Baker & Tiffany, 1985). Estos autores proponen que la habituación y la tolerancia son análogas ya que en ambas se presenta un decremento en la respuesta por la estimulación repetida; de acuerdo con este modelo, la exposición a la droga produce una representación del estímulo droga en la memoria, que es suficientemente sorpresivo como para que sea representado o impreso en la memoria, tal impresión puede ser mediada por procesos asociativos y no asociativos. De acuerdo a esto, un estímulo droga que ha sido impreso en la memoria inducirá menos procesamiento y una disminución en la respuesta, esto es la tolerancia. En términos no asociativos, bajo ciertos regímenes de administración, la respuesta de tolerancia no es específica a las señales contextuales, observándose una correlación entre dosis bajas e intervalos entre dosis largos (Poulos & Cappell, 1991).

Por otro lado, la función del contexto es analizado por la teoría de la “facilitación” (*occasion setting*) la cual fue introducida por Skinner (1938). Los facilitadores se refieren al potencial de un estímulo para indicar el valor de una clave difusa. El fenómeno de facilitación fue introducido en el análisis de condicionamiento clásico, donde el contexto precede a la presentación de un EC discreto, planteándose que el contexto puede adquirir la función de un indicador de la administración de una droga, por lo que los efectos de las drogas pueden adquirir la función del contexto más que de estímulos discretos, ya que los efectos de las drogas son estímulos difusos y constantes que se presentan en un periodo de tiempo.

En relación a cómo un organismo percibe el estímulo ó los estímulos para llevar a cabo asociaciones entre los estímulos se describen dos modelos: el elemental y el configuracional.

De acuerdo al modelo elemental, cada elemento o estímulo discreto puede entrar en asociación individual (Rescorla & Wagner, 1972) con otro estímulo (Fantino, 2001). En el modelo configuracional, el condicionamiento de un compuesto de estímulos entra en una sola asociación como señales configuracionales (Rescorla & Wagner, 1972) es decir, un conjunto de estímulos percibidos como un todo (Fantino, 2001).

Algunos investigadores han notado que en la adquisición del aprendizaje contextual el sujeto requiere llevar a cabo la integración de las características de una variedad de estímulos, así como de las diferentes modalidades para la formación de una representación de ese contexto. Por ejemplo, en algunas preparaciones, el condicionamiento de contexto parece que no ocurre a un solo componente del contexto, sino más bien a la configuración de todos los elementos (Bucci, Saddoris & Burwell, 2002). Fanselow (1990) sugiere que es necesario un tiempo largo para integrar y formar la representación configuracional de algunas características individuales y la visión del contexto, ésta integración de características podrían controlar la conducta después del condicionamiento.

Además, los procedimientos que limitan la cantidad del tiempo en el que las ratas son expuestas al contexto de entrenamiento, así como la preexposición a todos los elementos del contexto experimental en sesiones

separadas, parecen no facilitar el condicionamiento de contexto. Esto se debe a que la preexposición por separado no permite que se lleve a cabo el condicionamiento, por lo que es necesario la exposición al contexto por periodos largos para facilitar el condicionamiento configuracional, lo que sugiere que la representación configuracional del contexto es una variable importante en la adquisición del condicionamiento, más que con cada elemento por separado (Pickens & Holland, 2004).

Es decir, el contexto donde se administra la droga, es la integración de todas las características del ambiente particular (como un espacio físico) y puede tener un fuerte efecto en el desarrollo y/ o manifestación de la tolerancia y sensibilización. Por ejemplo, cuando a una rata se le administran inyecciones crónicas de anfetamina en un ambiente en el cual puede ingerir leche para compensar los efectos supresores de la anfetamina de ingestión de alimento, la conducta estereotipada es muy diferente que cuando a la rata le es dada la droga en un ambiente sin leche (Wolgin, 2000).

Estas teorías analizan la función e importancia de la asociación de estímulos bajo diferentes circunstancias en el modelo de condicionamiento clásico, lo cual ha sido demostrado en varios experimentos.

En el condicionamiento de contexto, cuando a los animales se les expone a apareamientos de EC-EI, no sólo aprenden la relación del EC-EI, sino también acerca del contexto (por ejemplo el cuarto de condicionamiento) donde ocurren los apareamientos (Pickens & Holland, 2004).

En otra investigación se observó un decremento significativo en el número de animales con signos de ansiedad durante la abstinencia de diazepam cuando se les expuso a nuevas señales ambientales diferentes a las del contexto que fueron asociadas con la administración de la droga (Pérez, Maglio, Marchesini, Molina & Ramirez, 2002).

En un estudio realizado por Cepeda-Benito, Tiffany y Cox (1999) se evaluó la tolerancia asociativa a los efectos analgésicos de la morfina por medio de dos métodos: presión en la pata y vocalización por choque en la cola. Se dieron tratamientos crónicos con morfina apareada o no apareada con un contexto distintivo, posteriormente los sujetos se evaluaron con morfina o placebo en el contexto. Los resultados demostraron que la tolerancia fue específica al contexto con ambas pruebas, pero no se evidenció la respuesta

compensatoria en las pruebas, por lo que concluyen que aunque los procesos pavlovianos pueden tener un papel importante en la adquisición de la tolerancia, no explican la ausencia de la respuesta compensatoria

Se han observado diferencias en el aprendizaje en animales cuando el aprendizaje requiere procesar eventos con múltiples estímulos que ocurren simultáneamente. En algunos animales un estímulo compite en el condicionamiento, resultando en un deterioro del aprendizaje de uno de los estímulos debido a la presencia de otro; en tanto en otros animales el aprendizaje a un estímulo particular de un evento, regularmente es saliente y raramente es deteriorado por la presencia de otro que ocurre simultáneamente (Brasser & Spear, 2004). El aprendizaje en estos eventos podría ser mediado en parte por el nivel de percepción, ya que algunos animales distinguen o perciben los elementos del compuesto por separado a los de un compuesto donde los eventos y los estímulos ocurren simultáneamente resultando en una respuesta más selectiva.

Estos hallazgos indican que los procesos del desarrollo de tolerancia antinociceptiva involucran un factor asociativo entre los efectos de las drogas y las señales contextuales. Por lo que a la tolerancia se le considera como un fenómeno compuesto de factores asociativos y no asociativos, donde la asociación de la administración de la droga a señales ambientales se puede analizar en ausencia del estímulo condicionado (Baker & Tiffany, 1985; Greeley & Cappell, 1985; Mototaka & Nobutaka, 2003; Siegel, 1976, 1983). En estas pruebas de tolerancia, cuando el estímulo condicionado no se presenta, no se desencadena la respuesta condicionada, provocando la disminución de la tolerancia porque la respuesta anticipatoria a los efectos de la droga no son inducidos (Siegel, 1975).

La tolerancia asociativa o dependiente del ambiente se observa cuando la droga es administrada por la misma vía y en el mismo ambiente usado en la prueba de tolerancia (Le et al., 1992). Esta tolerancia dependiente del ambiente ocurre porque la presencia de las señales ambientales (manipulación, procedimiento de administración de la inyección, cuarto donde se administra la droga, etc.) predicen la siguiente administración de la droga (Bell, Olson & Vaccarino, 1998). Se sugiere que estas señales inducen una respuesta

compensatoria a la droga, reduciendo su efectividad (Poulos, Hunt & Cappell, 1988; Siegel, 1983).

Es importante señalar que el modelo de Siegel no explica el fenómeno de tolerancia cuando el EC (contexto) está ausente, en este caso se refiere a la tolerancia farmacológica o no asociativa (Baker & Tiffany, 1985) y por otro lado, no siempre es posible observar la respuesta compensatoria por ejemplo cuando se evaluaron los efectos analgésicos de la morfina con el método de presión de la pata (Cepeda-Benito et al., 1999).

Con base en lo anterior, el factor más importante para el entendimiento de los mecanismos de la presencia de tolerancia por factores asociativos es el contexto donde ésta se desarrolla. El contexto se refiere a algunos aspectos de nuestro ambiente que tienen un papel importante en la determinación de la conducta. También puede referirse al estímulo que afecta el grado de condicionamiento al mismo, a eventos históricos que afectan la reacción al estímulo actual, o para un estímulo supraordenado que determina la respuesta apropiada a estímulos claves en una situación (Fantino, 2001). Así mismo, señala la importancia del valor del contexto como EC y fuente de reforzamiento alternativo que tiene en el condicionamiento clásico,

Por lo anterior, es importante señalar la necesidad de suficiencia de la contingencia, ya que se sugiere que la contigüidad por sí misma no es determinante durante el proceso de condicionamiento. Esto es, que el EC y el EI deben estar correlacionados de tal forma que el EC provea una información particular sobre el EI. Esto se traduce en que si no tenemos una relación temporal adecuada entre el EC y el EI, el EC fallará en producir condicionamiento si el EI se da también con frecuencia en ausencia del EC (Rescorla, 1967).

Lo que implica que si la señal que predice el EC es redundante o superficial, la contigüidad del EC y EI será irrelevante. En tales situaciones se esperaría que el condicionamiento no se presentara (Fantino, 2001). En estos casos, las teorías centran las diferencias en la efectividad de las diferentes fuentes de reforzamiento que se han centrado en el señalamiento o explicación informacional del condicionamiento clásico. En el contexto un

evento informa que algo nuevo puede ser evaluado sólo en ese contexto que es conocido.

La evidencia muestra que el desarrollo de la tolerancia puede ser controlada por factores del aprendizaje, específicamente contextuales (ambiente). En investigaciones de tolerancia a la morfina específica al contexto, animales que reciben morfina apareada con un contexto distintivo son más tolerantes a los efectos analgésicos de la morfina, que los animales que reciben el mismo tratamiento en otro ambiente diferente al contexto distintivo (Cepeda-Benito & Tiffany, 1996; Siegel, 1975; Tiffany, Drobles & Cepeda-Benito, 1992). De acuerdo al modelo de la respuesta compensatoria, estos efectos ocurren porque el contexto distintivo es un estímulo condicionado (EC) que induce la respuesta que es opuesta a los efectos de la droga (Siegel, 1975; Poulos & Cappell, 1991).

Asimismo, el desarrollo de tolerancia a los efectos analgésicos de la nicotina, se reduce cuando la administración de la droga ocurre en un nuevo ambiente (Smith, 1990), dado que el contexto asociado con la administración de la droga puede funcionar como estímulo condicionado al asociarse con las administraciones de la droga, se lleva a cabo el aprendizaje, el cual es dependiente del contexto. Lo que indica que la expresión de la tolerancia además de que depende de acciones farmacológicas también depende de procesos conductuales (Smith, 1990).

Por lo anterior, se puede decir que el desarrollo de la tolerancia depende de factores asociativos y de factores no asociativos. En el caso de los factores asociativos, la tolerancia es más pronunciada y dependiente del ambiente. La tolerancia no asociativa es independiente del ambiente y no se realiza ninguna asociación. También la tolerancia se correlaciona con la dosis e intervalos interdosis, así como de la integración de los estímulos de manera configuracional y otras veces en forma independiente.

5. Importancia de las señales droga en el desarrollo de tolerancia cruzada al etanol

Una evidencia importante de la generalidad del modelo de Siegel es su aplicación a drogas no opiáceas. Le, Poulos y Cappell (1979) realizaron una investigación para evaluar la contribución del aprendizaje asociativo en la tolerancia a los efectos hipotérmicos del alcohol. En uno de los experimentos, nueve ratas fueron sometidas a nueve inyecciones intraperitoneales de 2.5 g/kg de alcohol (12.5% v/v en solución salina isotónica). Las inyecciones fueron administradas cada tercer día en un ambiente distinto al que habitaban regularmente. Después de cada una de las inyecciones se midió la temperatura rectal a los 45, 60 y 75 minutos. En los días en que no se administraba alcohol, las ratas permanecían en su caja-hogar donde cada rata era inyectada con solución salina sin medir su temperatura. Después de esta fase, todos los sujetos fueron sometidos al procedimiento de administración de alcohol y medición de la temperatura en su caja-hogar. Después de un día, nuevamente todas las ratas fueron inyectadas con alcohol pero ahora en el ambiente diferente. Los resultados mostraron, que la tolerancia fue desarrollada y mantenida en el medio ambiente que fue apareado repetidamente con los efectos sistémicos del alcohol, pero que la tolerancia disminuyó en el ambiente que no fue asociado con la administración de alcohol, implicando con esto que un mecanismo de aprendizaje puede mediar la tolerancia no sólo a drogas como la morfina, sino también a drogas como el etanol.

Crowell, Hinson y Siegel (1981) replicaron y extendieron los hallazgos de la tolerancia aprendida al etanol reportados por Le y sus colaboradores. (1979). En este estudio en la Fase 1 dos grupos de ratas recibieron alternadamente inyecciones de etanol y de salina, hasta administrarse un total de 20 inyecciones de cada sustancia, una cada día. A un grupo de ratas se les administró salina en el cuarto donde regularmente habitaban y el etanol fue administrado en un cuarto especial con iluminación tenue y en presencia de ruido blanco. Para el otro grupo la administración de las dos sustancias se invirtió. En una segunda fase, todos los sujetos de los grupos recibieron una sesión de prueba de tolerancia, en la cual se administró etanol en el cuarto especial. En la Fase 3, los dos grupos fueron expuestos a las condiciones especiales de la fase de adquisición de tolerancia y recibieron cuatro

inyecciones de etanol y cuatro de salina. Después de esto, en la Fase 4, los dos grupos recibieron una segunda sesión de prueba en la cual la solución salina se administró en el cuarto especial. Durante el desarrollo del experimento se determinó la temperatura rectal, 15 minutos antes y 15, 30, 45, 60, 75, 105 y 120 minutos después de las inyecciones. Los resultados fueron, la manifestación de tolerancia a los efectos hipotérmicos del etanol en la fase de adquisición de ambos grupos. En la primera sesión de prueba se observó que los sujetos inyectados con etanol en el cuarto especial donde regularmente se les había administrado la droga, mostraron mayor tolerancia en comparación con el grupo al que se le administró etanol en el cuarto habitación durante la fase de adquisición. En la segunda sesión de prueba, cuando se administró salina en el cuarto especial, las ratas que habían sido inyectadas con etanol en ese cuarto, exhibieron una respuesta hipertérmica. Esto es, una respuesta condicionada contraria a los efectos sistémicos del etanol. Resultados semejantes fueron reportados por Mansfield y Cunninham (1980) y por Cedillo (2001) por lo que se puede suponer que un mecanismo asociativo pavloviano también puede mediar la tolerancia hacia los efectos hipotérmicos del alcohol.

Duncan, Alici y Woodward (2000) reportaron una mayor tolerancia a los efectos del etanol en la actividad locomotora, cuando los sujetos fueron evaluados en un ambiente que fue previamente apareado con el etanol comparado con el ambiente que fue previamente apareado con salina. De igual forma otros reportes sugieren que la tolerancia a la hipotermia inducida por el etanol es interrumpida por cambiar a los sujetos a un nuevo ambiente, o a un ambiente previamente apareado con salina, antes de la inyección de la droga (Le et al., 1979; Melchior, 1988; Tirrelli, Jodogne & Legros, 1992).

Otros estudios que apoyan que mecanismos asociativos pueden mediar la tolerancia son el de White, Roberts y Best (2002) que reportaron el desarrollo de tolerancia a los efectos atáxicos del alcohol; Seeley, Hawkins, Ramsay, Wilkinson & Woods (1996) quienes reportaron que la tolerancia a los efectos del alcohol que elevan los niveles de la corticosterona, fue interrumpida cuando los participantes fueron colocados en un cuarto nuevo antes de la administración del alcohol.

La tolerancia ha sido considerada una respuesta de adaptación a los cambios funcionales producidos por la administración de una droga, más que una perturbación producida por las propiedades físicas o químicas de la droga en si misma (Kalant, LeBlanc & Gibbens, 1971). La tolerancia a un efecto particular de una droga (hipotermia, sedación, etc.), también produce tolerancia cruzada a otras drogas que tengan el mismo efecto farmacológico que la primera (Le, Khanna & Kalant, 1987). Si a un organismo se le presenta la señal de la droga A, pero se le administra una droga B, el efecto de la segunda droga será el de una interacción de la respuesta condicionada (RC) a la droga A, y con la respuesta incondicionada (RI) a la droga B. Sin embargo, si ambas drogas tienen efectos similares, y la RC de la droga A compensa sus efectos, la RC a la droga B será atenuada en presencia de las señales o contexto de la droga A, produciéndose de esta forma la tolerancia cruzada. Cuando las drogas A y B tienen efectos diferentes, es posible observar varios tipos de interacción entre la RI y la RC. Como ya se mencionó, si el efecto de la droga B es opuesto al de la droga A, la respuesta condicionada compensatoria a la droga A será aumentar el efecto de la droga B.

El control del condicionamiento pavloviano en la tolerancia cruzada a los efectos sedantes ha sido demostrado en algunos estudios que han utilizado drogas como el etanol o pentobarbital (Cappell, Roach & Poulos, 1981; Melchior & Tobakoff, 1985). En otros estudios con procedimientos de preferencia de lugar se ha encontrado tolerancia cruzada entre morfina y nicotina (Zarrindast, Faraji, Rostami, Sahraei & Ghoshouni, 2003).

Como ya se dijo, la tolerancia cruzada a dos drogas, es el fenómeno donde un organismo responde menos a los efectos de una droga como consecuencia de tratamientos previos con otras drogas. Las teorías de tolerancia celular y tolerancia cruzada, postulan una adaptación celular a la estimulación farmacológica crónica de la respuesta de las neuronas a la droga como mecanismo de tolerancia y tolerancia cruzada. Las teorías de condicionamiento han sido propuestas para explicar el desarrollo de tolerancia a algunos de los efectos farmacológicos y conductuales del etanol (Poulos & Cappell, 1979).

En un estudio realizado por Wenger, McEvoy y Woods (1986) se presentó evidencia de que el aprendizaje media el desarrollo de tolerancia cruzada a los efectos conductuales comunes del pentobarbital y etanol. Se entrenó a 30 ratas a caminar en una rueda giratoria para evitar choques en 3 ensayos diarios por 5 días. Después los sujetos recibieron una práctica adicional mientras estaban intoxicadas con pentobarbital. Un grupo designado como práctica-intoxicado, pasó por sesiones diarias de 3 ensayos consecutivos 15 min después de haber recibido una inyección de pentobarbital en el cuarto experimental. En el grupo de exposición-pentobarbital los sujetos fueron expuestos a una sesión no estando intoxicados, y 15 min después fueron inyectados con dosis equivalentes de pentobarbital en el cuarto experimental. Un grupo control recibió 15 min antes de la sesión en el aparato, el tratamiento fue igual a los otros dos grupos, pero sin el pentobarbital. Después del desarrollo de tolerancia al pentobarbital, el tercer día se evaluó la tolerancia cruzada al etanol con una dosis de 28.0 g/kg. Los resultados mostraron que los sujetos que tuvieron práctica en la rueda giratoria bajo los efectos del pentobarbital presentaron tolerancia cruzada al etanol, mientras que los sujetos que no tuvieron la práctica en el aparato no presentaron tolerancia.

En otro estudio sobre tolerancia cruzada, se evaluó en ratas el efecto de la administración de etanol, pentobarbital y clordiazepóxido durante tres semanas sobre una prueba de evitación, y se observó tolerancia a los efectos en la actividad motora durante la prueba de evitación. La administración de las tres drogas resultó en una curva dosis respuesta desplazada a la derecha. La tolerancia a la benzodiazepina fue mayor y se observó un desarrollo de la tolerancia cruzada entre etanol y pentobarbital. Por otro lado, el tratamiento con clordiazepóxido provocó tolerancia cruzada al etanol y al pentobarbital; sólo se observó una tolerancia parcial al clordiazepóxido posterior al tratamiento con etanol o pentobarbital (Le, Khanna, Kalant & Grossi, 1986).

En relación a los efectos sedantes del etanol y pentobarbital, un estudio de Vila y Cedillo (1991) examinó el desarrollo de la tolerancia cruzada entre etanol y pentobarbital, utilizando otra respuesta común a ambas drogas como la sedación producida a dosis bajas de etanol y pentobarbital, que es una

respuesta susceptible a presentar tolerancia condicionada a señales ambientales (Siegel, 1989). Los resultados mostraron el desarrollo de tolerancia cruzada entre el etanol y el pentobarbital sobre la respuesta sedación.

Resumiendo, la tolerancia específica al contexto ha sido observada en una gran variedad de respuestas conductuales y fisiológicas inducidas por el etanol, y que la presencia de ésta dependerá de dónde se realiza la prueba, siendo más pronunciada si se realiza en el mismo contexto de asociación. Por lo que la tolerancia cruzada además de explicarse a nivel celular que se refiere a una adaptación celular a la estimulación farmacológica crónica de la respuesta de las neuronas a la droga, también se explica en términos conductuales.

Es importante señalar que la tolerancia se desarrolla en diferentes clases de drogas, de las cuales, a nivel clínico varias de ellas son prescritas para tratamientos de ansiedad como son las benzodiazepinas, por lo que en el siguiente capítulo se describen características importantes de éstas drogas, ya que diazepam y midazolam fueron evaluados en estos experimentos.

5.2 Tolerancia a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas

Las benzodiazepinas son usadas para tratar la ansiedad, clínicamente representa un problema el desarrollo de tolerancia a sus efectos ansiolíticos. En varias pruebas con animales se ha observado el desarrollo de la tolerancia después de tres semanas de tratamiento (Fernandes, et al., 1999; Treit, 1985a; Vellucci & File, 1979). Por ejemplo en un estudio de Irvine, Cheeta, Lovelock y File (2001) utilizando una prueba de interacción social en ratas se reportó que microinyecciones de midazolam (2-8 μ g) en el hipocampo dorsal produjeron tolerancia, cuando fueron pretratadas con nicotina durante 6 días. En tanto que con tratamientos de más de 6 días con diazepam (5 mg/kg) en una prueba punitiva con choques eléctricos se obtuvo el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam (Stephens & Schneider, 1985). Asimismo, Fernandes y File (1999) reportan el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam (2 mg/kg) en una prueba de interacción social después de 21 días; Fahey, et al., (2001) reportaron tolerancia al lorazepam (2

mg/kg/día), en una prueba de campo abierto con tratamientos de 14 días; Begg, Hallam y Norman (2005) obtuvieron tolerancia al diazepam (4 mg/kg) con administraciones de 14 días en pruebas de interacción social y en el LEC. En tanto Schmitt et al. (2001) reportaron tolerancia al diazepam (10 mg/kg) después de 23 días de tratamiento en una prueba en el LEC.

De acuerdo a los resultados de estos estudios, la tolerancia a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas se presenta con tratamientos crónicos de más de 6 días con diferentes dosis y en diferentes pruebas.

6. Actividad motora

El uso de ansiolíticos del grupo de las benzodiazepinas produce efectos que pueden no deberse exclusivamente a efectos ansiolíticos, sino a un deterioro general en la actividad motora, lo que podría modificar las respuestas en pruebas de laberinto. El efecto de los ansiolíticos en la conducta exploratoria es dependiente del tiempo: la facilitación de la conducta exploratoria generalmente ocurre durante la etapa inicial de la sesión de la prueba y podría revertirse durante la última parte de la sesión. Este efecto es probable que se relacione con que los ansiolíticos facilitan la exploración en los animales que no han tenido experiencia en el aparato de prueba, pero podría inhibir o no tener efecto en la exploración con animales con experiencia (Treit, 1985a).

Rodgers y Johnson (1995) confirman la existencia de factores relacionados a la ansiedad como la actividad locomotora y toma de decisión, y mostraron además tres factores relacionados a la ansiedad: la evaluación del riesgo, actividad vertical y conducta exploratoria, por lo cual la inclusión de conductas de medidas etológicas, demuestran la existencia de dimensiones conductuales adicionales.

La actividad locomotora es una medida que se utiliza frecuentemente para evaluar los efectos conductuales de diversas drogas (Beninger, Cooper & Mazurski, 1985). Por ejemplo, la nicotina (0.5 y 0.8 mg/kg) y epibatidina (3.0 µg/kg) incrementan la actividad locomotora (Janhunen, Linnervuo, Svenk & Ahtee, 2005). Las propiedades psicoestimulantes de la cafeína (2.5-20 mg/kg) sensibilizan y mejoran la actividad motora, la anfetamina produce sensibilización cruzada a la actividad motora inducida por la nicotina en ratones (Celik, Uzbay & Karakas, 2006).

En un estudio previo Kameyama y Nagasaka (1982), demostraron que ratas con experiencia con choques mostraron una clara supresión de la actividad motora cuando se les colocó en el mismo ambiente en el cual habían recibido el choque (EI). Después de 24 horas de administrar un choque de 1/10 Hz a 1/80 Hz también provocaron una marcada supresión de la motilidad. Pero tanto las ratas con y sin experiencia con el EI mostraron similar grado de actividad motora. Así mismo la supresión de la actividad motora fue consistente

con la respuesta condicionada al contexto (su caja-hogar), lo que demuestra la importancia del contexto asociado con las administraciones de los choques.

Si una droga decreta la ejecución en una tarea, es importante entender el efecto del fármaco sobre la actividad motora para considerar la posibilidad de los cambios conductuales en ésta actividad y no en otras conductas. La actividad locomotora es una medida que se utiliza frecuentemente para evaluar los efectos conductuales de diversas drogas

En un experimento de Rodgers y Johnson (1995) se observó en el LEC que los ratones mostraron un alto nivel de actividad, caracterizada por una cantidad significativa de locomoción, actividad vertical, exploración, evaluación de riesgo y toma de decisión.

Se ha encontrado que la administración continua de morfina (2 x 75 mg) y fentanil en pastillas (0.2 mg/kg/día) produce un patrón escalonado de actividad a través de los días de administración, este patrón fue observado en las medidas locomotoras, incluyendo movimientos básicos (conteo por fotoceldas), actividad horizontal (deambulación y distancia de los desplazamientos), actividad vertical (alzadas), movimientos finos y tiempo de espera activa, los resultados proveen evidencia de la sensibilización siguiendo a la administración continua de opioides (Trujillo, Kubota & Warmoth, 2004).

Vigorito, Lau, Tang y Falk (1991) encontraron el desarrollo de tolerancia al deterioro motor producida por la administración de midazolam (0.75-3 mg/kg) antes de la sesión de prueba donde se registró la actividad motora.

Con diazepam, los resultados indican en un estudio de Cooper (1985) que la administración de 100 μ /kg produce una inhibición significativa en la actividad locomotora en una prueba de 60 min. Otros estudios (Schmitt & Hiemke, 1998) han encontrado un alto nivel de actividad motora y conducta exploratoria en la prueba de campo abierto con diazepam. Lister y Hilakavi, (1988), reportaron que el diazepam incrementa la actividad exploratoria y tiende a mejorar la reducción de la exploración causada por la administración de etanol, esto es, el diazepam reduce la acción del etanol. Asimismo, se ha observado que los ratones son más sensibles a los efectos sedantes del diazepam (10 mg/kg) causando un deterioro motor, medido en la prueba de campo abierto, mientras que 1 mg/kg el diazepam estimula la actividad motora durante los primeros 5 min. En el LEC con dosis de 10 mg/kg de diazepam los

ratones muestran mayor sensibilidad a los efectos en el deterioro motor observado por una reducción significativa en el total de entradas a los brazos comparada con la línea base (Kralic et al., 2002).

También se ha encontrado que con una dosis de 2 mg/kg de diazepam, 30 min antes de la prueba en el campo abierto se observa un incremento significativo de la actividad (líneas cruzadas en los primeros 15 min), las ratas tratadas con diazepam permanecen más tiempo en el cuadro central que las ratas control, facilitando la actividad motora de las ratas cuando en los primeros minutos la novedad e incertidumbre estuvieron al máximo, indicando que los factores emocionales disminuyen la exploración y locomoción (Beaufour, Bihan, Hamon & Thiébot, 2001).

En tanto Marin, Pérez, Duero y Ramírez (1999) demostraron el desarrollo de tolerancia a la reducción de la actividad motora del diazepam (5 mg/kg) administrado 4 días en una prueba de campo abierto. Se observó un decremento en la actividad locomotora evidenciado por la reducción del número de entradas a los cuadros.

En un estudio de File (1981) se encontró que el triazolam (0.05-0.25 mg/kg) y el lorazepam (0.25 mg/kg) indujeron un mayor efecto sedante; ambas drogas redujeron la actividad exploratoria. En otro estudio se usó el flumazenil para evaluar las conductas de exploración e interacción social durante el periodo de retirada del etanol, los resultados mostraron que el flumazenil revirtió la respuesta de ansiedad en la interacción social durante la prueba de abstinencia al etanol (File, Baldwin & Hitchcott, 1989).

La actividad motora es importante, ya que el desplazarse de un lado a otro le permite al animal (rata) localizar los sitios donde se encuentra la comida, evitar o huir de situaciones peligrosas. Y cuando se administran benzodiazepinas que inhiben la ansiedad permite a los animales explorar y presentar mayor actividad, observándose el efecto ansiolítico con una administración aguda de alguna benzodiazepina con diferentes dosis.

7. Justificación

Planteamiento del problema:

La literatura sobre tolerancia, sugiere que el contexto es una variable importante en el desarrollo de la tolerancia. Si embargo, no es del todo claro qué aspectos del contexto pueden ser condicionados clásicamente. Lo que implica que los mecanismos de condicionamiento pueden jugar un papel en la tolerancia a las benzodiazepinas en ciertas situaciones. Si embargo, poca investigación se ha realizado manipulando cambios en el ambiente, para evaluar los efectos ansiolíticos de estas drogas y el desarrollo de tolerancia a éstos efectos evaluados en el LEC. Asimismo, la inducción de la tolerancia a los efectos provocados por las benzodiazepinas no son consistentes ya que estos dependen, además del tipo de benzodiazepina, del tipo de tratamiento y de la vida media del fármaco. Las benzodiazepinas de acción corta como el midazolam desarrollan más rápidamente tolerancia (Irvine et al., 2001) que las de acción larga como el diazepam (Fernandes et al., 1999).

Por lo anterior, se planteo el objetivo de evaluar el papel del contexto sobre la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam evaluado en un laberinto en cruz y la tolerancia cruzada de estas benzodiazepinas con el etanol, así como evaluar el efecto del flumazenil sobre la tolerancia asociativa.

Objetivos particulares:

- 1.- Evaluar el efecto de la administración del diazepam y midazolam en la respuesta de ansiedad medida en el LEC.
- 2.- Evaluar el efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam que tienen diferentes vidas medias.
- 3.- Evaluar el efecto sobre la tolerancia asociativa de la administración de flumazenil, un antagonista de las benzodiazepinas.
- 4.- Evaluar el efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia cruzada del diazepam y midazolam al etanol.

Hipótesis

1. El desarrollo de tolerancia asociativa a las benzodiazepinas, se observa con tratamientos crónicos y si la prueba de tolerancia se realiza ante el mismo contexto donde se administró la droga.

2. La tolerancia asociativa a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas es antagonizada por flumazenil.
3. El desarrollo de tolerancia cruzada diazepam y midazolam al etanol se obtiene con tratamientos crónicos y si la prueba de tolerancia se realiza ante el mismo contexto donde se administró la droga.

8. METODO GENERAL

Sujetos:

Se utilizaron ratas macho Wistar, experimentalmente ingenuas, de aproximadamente 200 g de peso al inicio del experimento, provenientes del Bioterio General de la FESI. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico transparente (5 sujetos por caja), bajo un ciclo de luz/obscuridad 8.00: 20.00 h con libre acceso a agua y comida durante cada experimento.

Aparatos:

LEC construido de PVC con dos brazos abiertos (50 x 10 cm), y dos brazos cerrados de la misma medida, elevado a 50 cm del piso, el nivel de iluminación fue de 50 lux. El laberinto se conforma de cuatro brazos: dos brazos cerrados y dos abiertos de tal forma que los brazos son opuestos entre si.

Cámara de videograbación. Se empleó una cámara (CCD, Modelo CA-156SEIA) localizada 1 m arriba del cuadro central del laberinto, lo cual permitía una visión de los 4 brazos del laberinto. Los registros fueron grabados (Videograbadora WJ-2096) y analizados posteriormente con el *Software Observer* (Universidad de Sao Paulo, Brazil).

Cámara de actividad motora. Una cámara construida de acrílico (30x30x20) de altura, ancho y profundidad respectivamente, con dos hileras de fotoceldas dentro de la caja, a 2 y 11 cm del piso, y con 2 cm de distancia entre las fotoceldas. La hilera de fotoceldas más cercana al piso detecta la actividad horizontal (deambular) y la hilera alta detecta la actividad vertical (alzadas) en cada rata.

Drogas

Diazepam y Midazolam (Roche, México,) ip diluidos en solución salina (0.9%), en ambos casos con una dosis de 1 mg/kg. Esta dosis se determinó con base en una curva dosis-respuesta, donde con 1 mg/kg de diazepam y midazolam se observó mejor el efecto ansiolítico, sin afectar la actividad motora, dado que el efecto de sedación se observó a dosis más altas a la elegida. Dosis equivalentes se han empleado en investigaciones previas,

donde con 1mg/kg de diazepam se observó el desarrollo de tolerancia al efecto anticonvulsivo (Kalynchuk, Kim, Pinel & Kippin, 1994); mientras que con midazolam se observó el efecto ansiolítico evaluado en el laberinto elevado en cruz (Bertoglio & Carobrez, 2002b; Cruz-Morales, Santos & Brandão, 2002). En el caso del etanol se ha reportado que 1.5 g/kg en una solución al 20% producen el mismo efecto (Bertoglio & Carobrez, 2002a). Finalmente, se ha demostrado que la dosis de 5 mg/kg de flumazenil revierte el efecto ansiolítico (Pratt, Brett & Laurie, 1998).

CONTEXTO:

El contexto se define como el espacio físico que conforma el Bioterio o Laboratorio en el cual los estímulos condicionados discreto/continuo (por ejemplo un ruido y/o los estímulos que integran estos espacios físicos) y los estímulos incondicionados (por ejemplo una droga) son presentados a las ratas. En el primer experimento el cambio de contexto fue dado por la presencia de un estímulo discreto (ruido de 70 db). En el segundo experimento el cambio de contexto fue el lugar físico, Laboratorio o Bioterio.

-Ruido Blanco: Se define como ruido aleatorio que contiene energía constante a cada frecuencia o más preciso una distribución uniforme de la energía sobre el espectro de frecuencias.

-*Bioterio*: Este espacio físico se integra de las jaulas donde se colocaron a las ratas, 2 estantes, una mesa, una balanza con la que se pesaba a los sujetos y tenía luz natural.

-*Laboratorio*: En este se encuentra el laberinto elevado en cruz, el equipo de videograbación, un generador de ruido blanco y la luz fue de 50 lux.

Variables independientes:

Tipo de droga, tipo de contexto y tipo de tratamiento (agudo o crónico)

Variables dependientes

-Ansiedad: medida por el porcentaje de entradas en los brazos abiertos y a los brazos cerrados, porcentaje de tiempo de espera en los mismos y tiempo de espera en el centro del laberinto. Donde un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos son un índice de ansiedad.

Actividad motora, medida por la deambulaci3n y alzadas del animal. Los resultados de estas medidas nos permiten descartar que los cambios en la actividad motora tanto horizontal como vertical no son el resultado de los tratamientos farmacol3gicos al no presentarse diferencias en ambas.

Registro de datos: Se grab3 la sesi3n para posteriormente registrar los par3metros conductuales que son la frecuencia del n3mero de entradas a los brazos abiertos y cerrados, as3 como la cantidad de tiempo de permanencia en estos para cada uno de los sujetos. El criterio en ambos casos era que los sujetos tuvieran las 4 patas en el brazo. La sesi3n fue de cinco minutos. Estos datos se usan para calcular el porcentaje de entradas a los brazos abiertos $[\text{No. entradas a brazos abiertos} / (\text{No. abiertos} + \text{cerrados}) \times 100]$ y porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos $(\text{tiempo en brazo abierto} / 300 \times 100)$.

An3lisis de datos

Los datos fueron analizados mediante pruebas estad3sticas param3tricas debido a que los datos obtenidos de los experimentos se distribuyen normalmente. Se emple3 la prueba t para comparar dos grupos independientes (tratamiento). Se utilizaron ANOVAS de una v3a con el tratamiento como factor para la respuesta de ansiedad evaluada por el porcentaje de entradas y de permanencia en los brazos abiertos. Cuando se detectaron diferencias significativas se aplic3 la prueba estad3stica de Tukey para diferencias entre pares de grupos. Se realizaron an3lisis independientes para la actividad motora horizontal y vertical por medio de ANOVAS de medidas repetidas, para detectar las posibles diferencias con tratamiento como factor entre grupos y tiempo como factor intrasujetos, seguidos por la prueba de Tukey.

9. Experimento 1

9.1 Experimento 1 A

Efecto de la administración aguda de diazepam en el LEC y actividad motora

El diazepam así como el midazolam son usados para tratar estados de ansiedad y tensión. Como todas las drogas de su clase, actúan deprimiendo el sistema nervioso central, produciendo diferentes efectos como el ansiolítico en función de la dosis administrada. Este experimento tuvo como objetivo demostrar el efecto ansiolítico del diazepam en el LEC con una dosis de 1 mg/kg.

Procedimiento

Los sujetos fueron asignados al azar a dos grupos ($n=8$), los cuales recibieron una administración de diazepam (D) 1 mg/kg o solución salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg), inyectado intraperitonealmente (ip) en el contexto laboratorio (L) 30 min antes de la evaluación en el LEC del efecto ansiolítico del D durante 5 min. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto fue trasladado al cuarto donde se encontraba la caja de actividad motora y se colocó al sujeto dentro de ésta durante 30 min, a intervalos de 5 min, para evaluar y registrar la actividad motora del sujeto tanto vertical como horizontal. Se consideró este tiempo por la vida media de los fármacos utilizados, a los 30 min se observa el efecto ansiolítico y posteriormente la droga se va eliminando y disminuye su efecto.

Resultados

En el porcentaje de entradas a brazos abiertos se encontraron diferencias significativas al aplicarse una prueba t-student ($p < 0.05$).

La Figura 1, representa el porcentaje de entradas a brazos abiertos, mostrando las comparaciones de los grupos salina (S) y diazepam (D), observándose el efecto ansiolítico del D, indicado por un mayor porcentaje de entradas a los brazos abiertos.

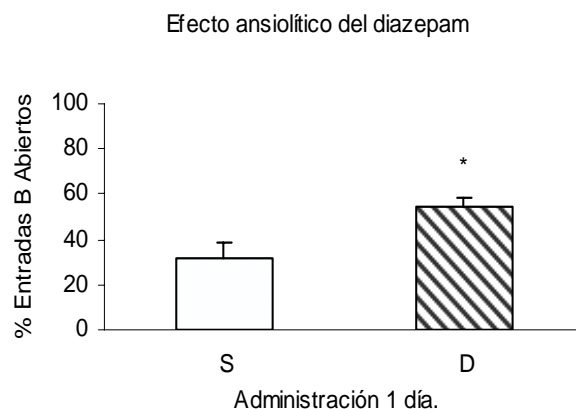


Figura 1. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos, por la administración aguda de D. * $p < 0.05$ vs. S. S = Salina, D = Diazepam.

En el porcentaje de tiempo en brazos abiertos se obtuvieron diferencias significativas con la prueba t-student ($p < 0.05$).

La Figura 2, muestra las diferencias significativas al compararse el grupo de S respecto al grupo D, indicando el efecto ansiolítico de este fármaco por un mayor porcentaje de permanencia en los brazos abiertos.

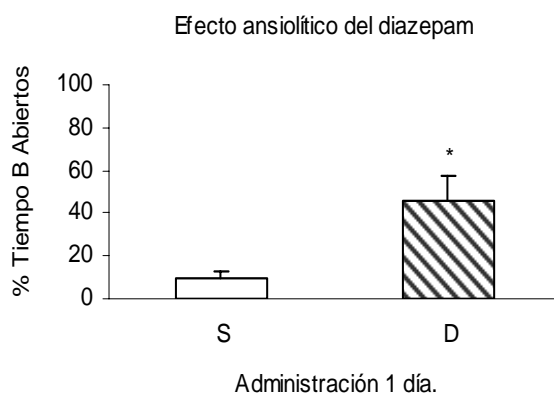


Figura 2. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. * $p < 0.01$ vs. S. S = Salina, D = Diazepam.

No se obtuvieron diferencias significativas en el total de entradas en la prueba de 5 min en el LEC. Lo que sugiere que el efecto ansiolítico del diazepam no afecta la actividad motora. Lo cual se corrobora con la prueba de actividad motora donde no se encontraron diferencias significativas ni en la

actividad motora vertical ni en la horizontal como resultado de los tratamientos ($p > 0.5$) en ambos grupos.

9.2 Experimento 1 B

Efecto ansiolítico del midazolam

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la administración aguda de midazolam en el LEC.

Procedimiento

Se siguió el mismo procedimiento que en el Experimento 1, excepto que se administró midazolam (1 mg/kg, ip) 15 min antes de la evaluación en el LEC.

Resultados

En la Figura 3 se observa el efecto ansiolítico del midazolam mostrado por un mayor porcentaje de entradas a brazos y tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Las diferencias fueron significativas en ambos casos al aplicarse una prueba t ($p < 0.01$) y ($p < 0.001$) respectivamente, observándose el efecto ansiolítico del midazolam.

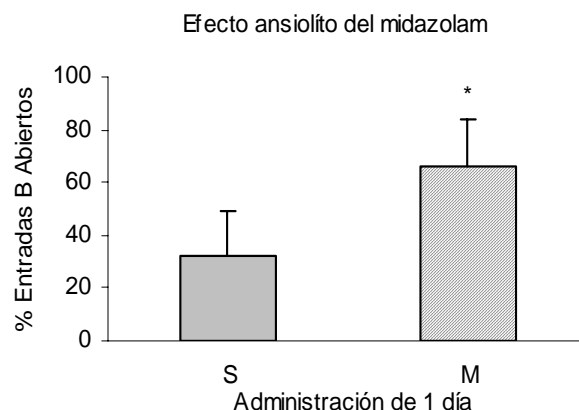


Figura 3. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos por grupos: * $p < 0.01$ vs. S. S = Salina, M = midazolam laboratorio.

La Figura 4 representa el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos, entre el grupo de S y de M, obteniéndose el efecto ansiolítico

del midazolam indicado por un mayor porcentaje de permanencia en los brazos abiertos.

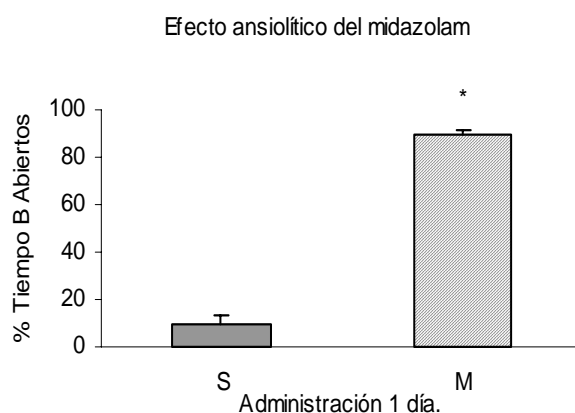


Figura 4. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos: * $p < 0.0001$ vs S. S = Salina, M = midazolam.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el total de entradas en la prueba de 5 min en el LEC. En la actividad motora horizontal, ($F_{(1,14)} = 0.506$) y en la vertical ($F_{(1, 14)} = 2.98$) no se obtuvieron diferencias en la interacción de los factores tiempo ($p < 0.05$) tampoco por el factor tratamiento ($p > 0.05$).

Discusión y conclusiones

De acuerdo a estos resultados, la administración aguda de 1 mg/ kg de midazolam y diazepam, produjo ansiólisis. Estos efectos concuerdan con los reportados por Rodgers y Shepherd (1993), quienes reportaron el efecto ansiolítico del diazepam con dosis de 2-4 mg/kg en el LEC con ratones; Fernandes, Andrews y File (1994) con dosis de 2 mg/kg; Cruz, Frei y Graeff (1994) con dosis de 2.5 mg/kg y Szyndler et al. (2001) con 1.5 mg/kg.

Los datos obtenidos con midazolam son consistentes con los reportados por Bertoglio & Carobrez (2002b) y Cruz-Morales et al. (2002) con dosis de 1 mg/kg con midazolam, en los cuales se detectó el efecto ansiolítico en el LEC. En este experimento, el efecto ansiolítico se observó en la conducta exploratoria de los sujetos en las entradas y en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos que fue mayor comparada con los sujetos control. De acuerdo a Leveleki et al., (2006) los espacios abiertos provocan una aversión

natural a estos, por lo que los sujetos suelen evitarlos, sin embargo en el presente experimento el efecto ansiolítico se traduce en que los sujetos entran y pasan más tiempo en los brazos abiertos, es decir se reduce la aversión a los brazos abiertos debido al efecto ansiolítico del diazepam y del midazolam.

Es importante resaltar que el efecto ansiolítico de estas benzodiazepinas en los presentes resultados fue diferente, siendo más potente el efecto ansiolítico por el midazolam que el diazepam, ya que con la misma dosis de midazolam se observó un mayor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

El total de entradas a los brazos abiertos no se modificó por la administración de las benzodiazepinas, por lo que se puede descartar que el efecto ansiolítico observado se deba a cambios en la actividad motora. Este efecto se corroboró al no observarse cambios en la prueba de actividad motora, sólo un decremento como consecuencia de la habituación por el paso del tiempo.

Asimismo estos resultados, apoyan y extienden la utilidad del modelo del LEC como un procedimiento de prueba sensible a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas.

Se concluye que el efecto ansiolítico por la administración aguda de diazepam y midazolam se presenta con dosis de 1 mg/kg en una prueba en el LEC, siendo mayor el efecto con el midazolam.

Experimento 2

10.1 Experimento 2 A

Desarrollo de tolerancia condicionada al diazepam

Existe evidencia que muestra que la tolerancia farmacológica no es la sola consecuencia inevitable de las administraciones repetidas de una droga, sino que su manifestación se ve influida por los mecanismos de aprendizaje que pueden influir en la adquisición y desarrollo de tolerancia hacia las drogas mediante el condicionamiento clásico (Larson & Siegel, 1998; Melchior & Tobakoff, 1985; y Siegel, 1977). Estos autores señalan que la tolerancia se presenta a su máximo sólo cuando al organismo se le administra la droga en presencia de señales que anteriormente habían estado presentes en el momento de la aplicación de la droga.

Asimismo se ha reportado que benzodiazepinas como el diazepam y midazolam desarrollan tolerancia farmacológica con exposiciones de 15 a 20 días (File, 1985b). Sin embargo no se han realizado estudios donde se evalúe el efecto del contexto al efecto ansiolítico de ambas benzodiazepinas en el LEC. Por lo que el objetivo de este experimento fue evaluar si el contexto como un estímulo discreto (ruido) afecta el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam con exposiciones de 21 días a ambas drogas.

Procedimiento

Los sujetos fueron asignados al azar en tres grupos ($n=8$). Estos grupos recibieron 20 días de administraciones 1 por día, en dosis de un 1 mg/kg, ip en el contexto laboratorio. Dos grupos recibieron administraciones crónicas de diazepam (D) y el tercer grupo recibió tratamientos crónicos con salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg).

Prueba de tolerancia.

Las pruebas para evaluar el desarrollo de tolerancia al diazepam en el LEC, se realizaron el día 21 en el laboratorio 30 minutos después de la administración del diazepam, indicada por un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

Los tres grupos recibieron el mismo tratamiento que en la fase de desarrollo de tolerancia, excepto que uno de los dos grupos con tratamientos crónicos de diazepam se le probó ante un nuevo estímulo (ruido) grupo DR. Las pruebas fueron grabadas por la cámara de video y posteriormente fueron analizadas. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto fue trasladado al cuarto donde se encontraba la caja de actividad motora y se colocó al sujeto dentro de ésta durante 30 min, para registrar la actividad motora del sujeto.

Resultados

Las Figuras 5 y 6 muestran el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam indicado por un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos comparado con el grupo S. No se demostró el efecto de contexto como un estímulo discreto (Ruido) en el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam, en el porcentaje de entradas a brazos abiertos ($p > 0.05$) ni en el porcentaje de tiempo de permanencia a los brazos abiertos ($p > 0.05$). Aunque en el grupo DR se obtuvo un porcentaje mayor en ambas medidas respecto al grupo S, se esperaba que el efecto del nuevo estímulo (ruido) incrementara en mayor magnitud las entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos, por lo que diferencias no son estadísticamente significativas.

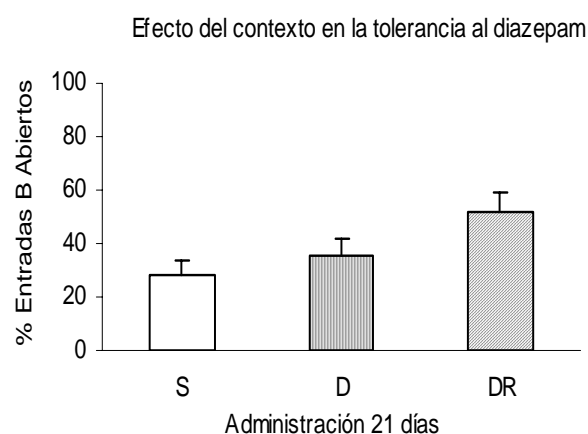


Figura 5. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos con administraciones crónicas. No hubo diferencias significativas $p > 0.05$. S = Salina, D = Diazepam, DR = Diazepam y Ruido laboratorio.

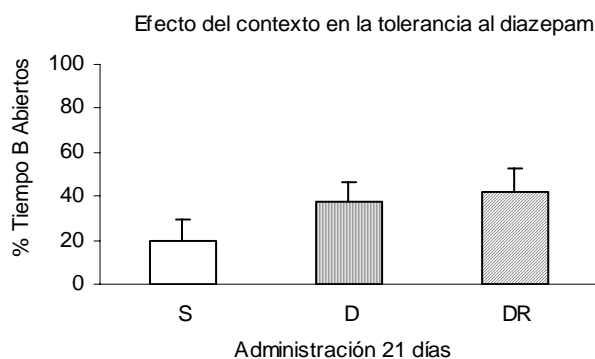


Figura 6. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos con administraciones crónicas. No hubo diferencias significativas $p > 0.05$. S = Salina, D = Diazepam, DR = Diazepam y Ruído laboratorio.

En el total de entradas no se obtuvieron diferencias significativas.

Al analizarse los registros de la prueba de actividad motora, con un ANOVA de medidas repetidas en la interacción de los factores (tratamiento/tiempo) en la actividad horizontal no se detectaron diferencias significativas en la interacción tratamiento/tiempo ($p > 0.05$).

La Figura 7 representa los promedios de la actividad motora vertical, y se observa la interacción tratamiento/tiempo ($F_{(12,19)} = 3.02$; $p < 0.01$). Con la prueba Tukey, se observó que los grupos D ($p < 0.01$) y del grupo DR ($p < 0.001$) difirieron respecto al grupo S. Como se observa en los primeros 15 minutos, la actividad vertical es afectada por el tratamiento ya que presenta menos actividad en los grupos de diazepam y posteriormente se presentó el fenómeno de habituación conforme transcurría el tiempo.

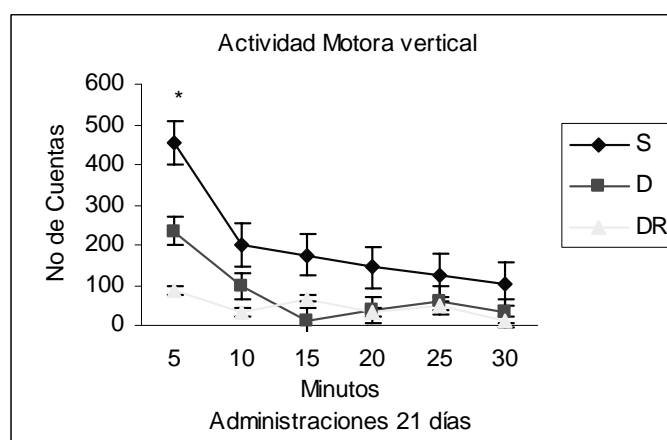


Figura 7. Muestra las medias \pm EEM de la actividad vertical, después del tratamiento crónico con diazepam (D) a diferentes intervalos. * $p < 0.05$ vs S. DR = Diazepam y Ruído laboratorio.

10.2 Experimento 2 B

Desarrollo de la tolerancia condicionada al midazolam

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del contexto ruido con administraciones crónicas de midazolam a su efecto ansiolítico en el LEC.

Se siguió el mismo procedimiento que en el Experimento 1 2A, excepto que se administró midazolam y la evaluación en el LEC fue 15 min después de la administración.

Resultados

Las Figuras 8 y 9 muestran los promedios del porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en brazos abiertos respectivamente. Los resultados demostraron el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del midazolam, ya que no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo S, indicado por un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos; no se obtuvo el efecto de contexto en el porcentaje de entradas a brazos abiertos ($p > 0.05$) ni en el porcentaje de tiempo de permanencia a los brazos abiertos ($p > 0.05$), cuando las comparaciones se hacen con respecto al grupo de administraciones crónicas de S.

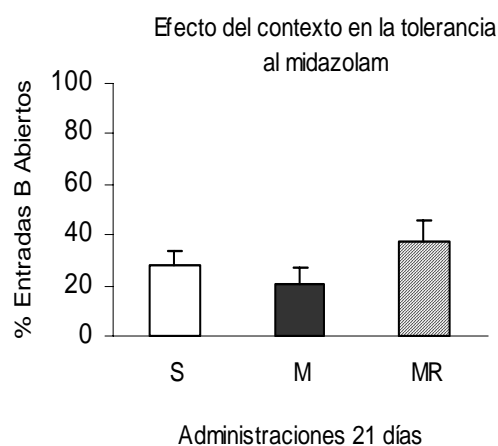


Figura 8. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos. No hubo diferencias significativas $p > 0.05$. M= Midazolam; MR = Midazolam con ruido laboratorio.

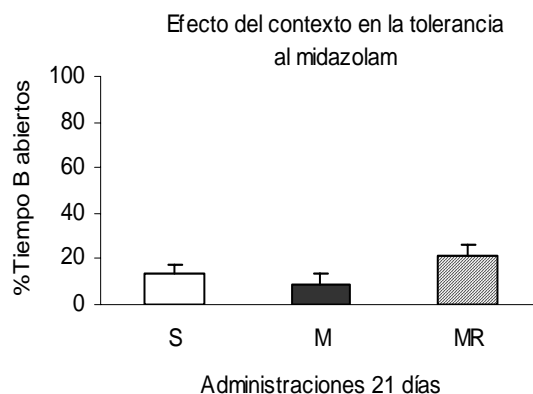


Figura 9. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. No hubo diferencias significativas $p > 0.05$. M= Midazolam; MR = Midazolam con ruido laboratorio.

No se obtuvo el efecto del contexto en el grupo MR cuando se le evaluó con el estímulo ruido en el mismo contexto donde recibió las administraciones previas de midazolam.

En el número total de entradas a los brazos, tampoco se obtuvieron diferencias significativas, lo que indica que el tratamiento no afecta la actividad motora de los sujetos.

Discusión y conclusiones

Los presentes resultados demostraron el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam después de 21 días de tratamiento, cuando a los sujetos se les evaluó en el mismo contexto (sin ruido) donde se realizaron las administraciones previas. De acuerdo al modelo de Siegel el desarrollo de la tolerancia se observa si la prueba se realiza en el mismo contexto donde se llevan a cabo las asociaciones de las administraciones de la droga, y ésta no se observa si la prueba se realiza en un nuevo contexto. Los presentes resultados apoyan los hallazgos de los resultados de Treit (1985a) que obtuvo tolerancia a la duración de la reacción de la conducta defensiva después de 10 días de tratamiento con diazepam pero con dosis altas (3 mg/kg). Así mismo, apoya los hallazgos de Rodgers y Shepherd (1993) y Stephens y Schneider (1985) con dosis de diazepam de 2-4 y 5 mg/kg, con tratamientos de 6 días respectivamente. Sin embargo, no se

observó el efecto ansiolítico cuando a los grupos de diazepam y midazolam se les evaluó ante un nuevo estímulo (ruido), donde se esperaba de acuerdo al modelo de Siegel un mayor efecto ansiolítico por el cambio de contexto al de sus administraciones previas. Lo que indica que los sujetos no percibieron o no les afectó en gran medida el cambio en el contexto (ruido).

Bajo este planteamiento las administraciones y prueba de los grupos crónicos fueron en el mismo contexto laboratorio y aunque se detectó en el grupo DR un incremento al efecto ansiolítico, por la exposición a un nuevo estímulo (ruido) durante la prueba (cambio de contexto), no fue estadísticamente significativo el resultado. Resultados similares se obtuvieron con midazolam, donde el grupo con administraciones crónicas sin ruido se probó en las mismas condiciones al de sus administraciones previas, mostró una disminución al efecto ansiolítico y no hay diferencia con el grupo de salina, lo que es indicativo del desarrollo de tolerancia a este efecto. Se observó una tendencia al efecto del contexto en el desarrollo de tolerancia, dado que en el grupo evaluado con un nuevo estímulo (Ruido) (MR), el porcentaje de entradas y permanencia en los brazos abiertos fue mayor, sin embargo la diferencia no fue significativa estadísticamente. Por lo anterior, se puede concluir que tanto el diazepam y el midazolam produjeron tolerancia y ésta fue independiente del contexto.

Dos posibles explicaciones a estos resultados, es que el estímulo ruido no resulta saliente para los sujetos en estas condiciones de prueba, y no predice confiablemente al efecto incondicionado de ambas benzodiazepinas. Lo que nos hace suponer que los sujetos no percibieron en forma independiente el contexto donde se realizaron las administraciones del diazepam y midazolam (Laboratorio).

Una segunda posibilidad para explicar los resultados del diazepam, es lo planteado por Fanselow (1990), quién sugiere que es necesario un intervalo largo (mínimo 24 hrs) entre las administraciones para que los sujetos logren integrar los estímulos presentes durante las administraciones y formar la representación configuracional de las características particulares del contexto, y así facilitar la asociación entre los estímulos. En este experimento se referiría al contexto laboratorio más el ruido, el cual fue presentado durante la prueba en el LEC donde a uno de los grupos crónicos se le evaluó en el mismo

contexto de las administraciones, pero se presentó un nuevo estímulo (Ruido), que de acuerdo a los resultados obtenidos, no modificó el desarrollo de tolerancia ni para el diazepam ni con el midazolam. Lo que hace suponer que los sujetos de estos experimentos no percibieron los estímulos en forma independiente ya que al manipularse el contexto donde se realizaron las administraciones y la prueba con un nuevo estímulo, no provocó el efecto de contexto esperado que era menor tolerancia. Los resultados de este experimento parecen apoyar la teoría asociativa de Rescorla y Wagner (1972) y Fantino (2001) donde se dice que los organismos integran los estímulos del contexto como un compuesto y no en forma independiente o aislada, lo cual sería necesario estudiar.

Por último, el hecho de que no se observaran cambios en el número total de entradas a los brazos, y en la actividad motora horizontal, descarta que los cambios observados en el LEC sean debidos a cambios en la actividad motora.

Se puede concluir que las diferencias en los resultados de estos experimentos en relación al efecto de contexto se deben posiblemente a que la tolerancia asociativa no se observó por la dosis utilizada, la saliencia del estímulo y la restauración homeostática por parte del organismo al estar bajo una nueva condición como fue la presencia del ruido.

Experimento 3

11.1 Experimento 3 A

Desarrollo de la tolerancia condicionada configuracional del diazepam

En el experimento previo se observó tolerancia independientemente del contexto, cuando el contexto fue un estímulo discreto (ruido).

Sin embargo hay datos que sugieren un mayor efecto del contexto cuando en lugar de presentar estímulos discretos aislados, se presenta el contexto como un compuesto de estímulos (configuración) observándose un mayor control de este. Existen datos que sugieren que los sujetos perciben el contexto donde se realizan las administraciones de la droga en forma configuracional (Fantino, 2001; Gerlai, 1998; Rescorla & Wagner, 1972). Esto es, los organismos perciben las características de los estímulos que integran el contexto como un compuesto y no en forma aislada. Con base en estos planteamientos, se realizó el Experimento 3 con el objetivo de estudiar el efecto del contexto como un compuesto de estímulos (Laboratorio y Bioterio) sobre el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam.

Procedimiento

Desarrollo de la tolerancia al diazepam

Los sujetos se asignaron aleatoriamente a 3 grupos ($n=8$). Dos grupos (D y DB) fueron inyectados con 1 mg/kg, ip de diazepam por 20 días (1 por día), el grupo D fue inyectado en el laboratorio y el segundo en el bioterio (DB). El tercer grupo fue inyectado con salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg) en el laboratorio; 30 min después de las administraciones se les regresó a su caja de alojamiento.

Prueba de tolerancia.

El día 21 a los grupos D y DB se les administró en el contexto laboratorio diazepam (1.0 mg/kg, ip) y al tercer grupo S se le administró solución salina en un volumen equivalente en el mismo contexto, siguiendo el mismo procedimiento que en la Fase I. Se colocó a cada sujeto en el laberinto elevado en cruz durante 5 minutos, se grabó la sesión y posteriormente se registraron los diferentes parámetros conductuales. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto fue trasladado al cuarto donde se encontraba la caja de

actividad motora y se colocó al sujeto dentro de ésta durante 30 min, para evaluar la actividad motora.

Resultados

En las Figuras 10 y 11 se muestra los promedios por grupos del porcentaje de entradas a brazos abiertos y el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos respectivamente. No se obtuvieron diferencias significativas ni en el porcentaje de entradas a brazos abiertos ($p > 0.05$) ni en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($p > 0.05$). Cabe señalar que los resultados del grupo con administraciones crónicas que fue evaluado en el mismo contexto de sus administraciones previas desarrollo tolerancia al efecto ansiolítico, ya que no se obtuvieron diferencias contra el grupo de salina. Asimismo, al grupo que se le evaluó en un contexto diferente al de sus administraciones de la droga (DB) mostró un mayor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos pero las diferencias no fueron significativas, por lo que se puede concluir que la tolerancia al efecto ansiolítico no se modificó por el cambio de contexto.

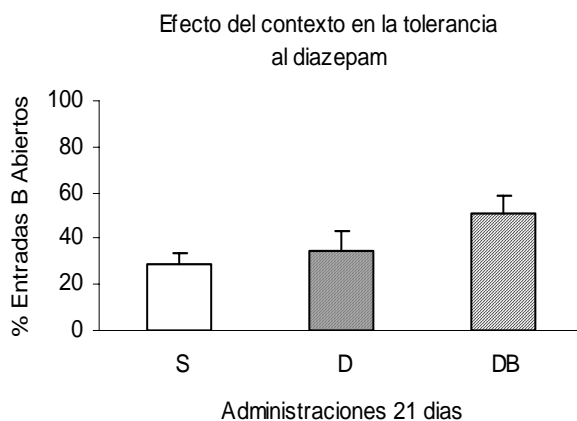


Figura 10. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos. D = diazepam laboratorio, DB = Diazepam bioterio.

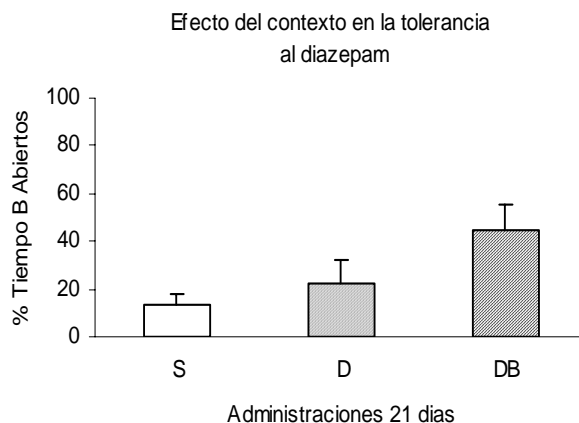


Figura 11. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. D = diazepam laboratorio, DB = Diazepam bioterio.

No se obtuvieron diferencias significativas en el total de entradas. En la actividad motora no se obtuvo el efecto sobre la interacción tratamiento/tiempo tanto en la actividad vertical como la actividad horizontal ($p > 0.05$). Por lo que se descarta que el tratamiento altere la actividad motora de la rata.

11.2 Experimento 3 B

Efecto del contexto configuracional en el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del midazolam

El objetivo de este experimento fue demostrar el efecto del contexto a nivel configuracional en el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del midazolam en el LEC.

Los sujetos se asignaron a 3 grupos ($n=8$) que recibieron por 20 días (1 por día), uno de los siguientes tratamientos: 1 mg/kg de midazolam administrado en el laboratorio (M), en el bioterio (MB), y el tercer grupo fue inyectado con salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg) en el laboratorio; 30 min después de las administraciones se les regresó a su caja de alojamiento.

Prueba de tolerancia.

El día 21 a los grupos M, MB se les administró en el contexto laboratorio midazolam (1.0 mg/kg ip) y al grupo S se le administró solución

salina en el mismo contexto. La prueba inició colocando a cada sujeto en el laberinto elevado en cruz durante 5 minutos, se grabó la sesión y posteriormente se registraron los diferentes parámetros conductuales. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto fue trasladado al cuarto donde se encontraba la caja de actividad motora y se colocó al sujeto dentro de ésta durante 30 min, para evaluar la actividad motora.

Resultados

Los resultados demostraron el efecto del contexto configuracional al efecto ansiolítico del midazolam, observado en un mayor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos en el en el grupo MB.

La Figura 12 muestra las diferencias significativas en el porcentaje de entradas a brazos abiertos ($F_{(2,19)} = 9.05$; $p < 0.01$). El grupo MB evaluado en un contexto diferente al de sus administraciones previas difirió del grupo S ($p < 0.01$) y del grupo M ($p < 0.05$). Lo anterior, por un lado indica el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del midazolam observado por un menor porcentaje de entradas a los brazos abiertos en el grupo evaluado en el mismo contexto de las administraciones previas en este grupo (M), ya que no se observan diferencias con el grupo S.

Por otro lado, también se obtuvo el efecto de contexto sobre la tolerancia al efecto ansiolítico del midazolam en el grupo que tuvo tratamientos crónicos en el Bioterio y el día de la prueba se le evaluó en un contexto diferente que fue el Laboratorio, ya que en este caso no se mostró la tolerancia, pero si un incremento en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos comparado con los otros dos grupos.

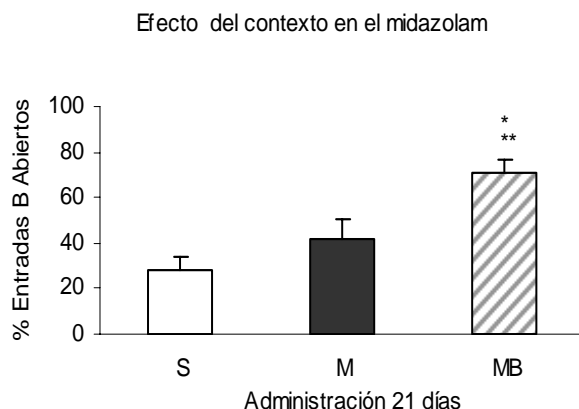


Figura 12. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos. ** $p < 0.01$ vs S; * $p < 0.05$ vs M. M = midazolam laboratorio, MB = midazolam bioterio.

La Figura 13, indica el promedio del porcentaje de tiempo de permanencia a los brazos abiertos y muestra las diferencias significativas ($F(2,19) = 33.93$; $p < 0.001$).

Al hacerse las comparaciones entre grupos se obtuvieron diferencias significativas del grupo M ($p < 0.05$), del grupo M y MB ($p < 0.001$) respecto al grupo S. No se obtuvo el desarrollo de tolerancia en el grupo de administraciones crónicas de midazolam en el laboratorio (M). Sin embargo el efecto de contexto se manifestó por un incremento en esta medida en el grupo de administraciones crónicas en el bioterio (MB).

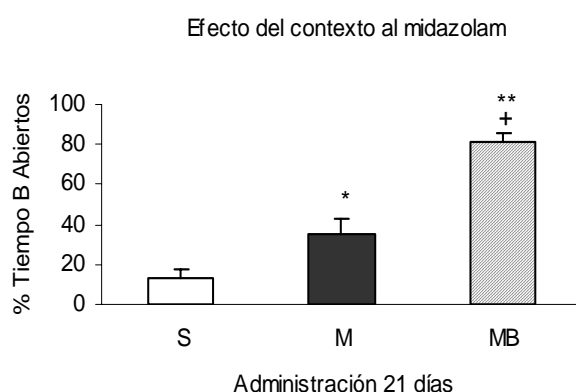


Figura 13. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs S; + $p < 0.001$ vs M. M = Midazolam laboratorio, MB = Midazolam bioterio.

Respecto al total de entradas no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$), lo que indica que la actividad motora no es afectada por el tipo de tratamiento.

En la Figura 14 se muestran los promedios de la actividad motora vertical por grupos; sólo se detectaron diferencias significativas en la actividad vertical, donde las diferencias fueron estadísticamente significativas ($F_{(2,19)} = 8.80$; $p < 0.01$) en la interacción tratamiento/tiempo. Estas diferencias se obtuvieron al aplicar la prueba Tukey, mostrando las diferencias entre los grupos crónicos de S respecto a M ($p < 0.05$) y MB ($p < 0.01$). Indicando un deterioro en los primeros 10 min y posteriormente se observa el efecto de habituación.

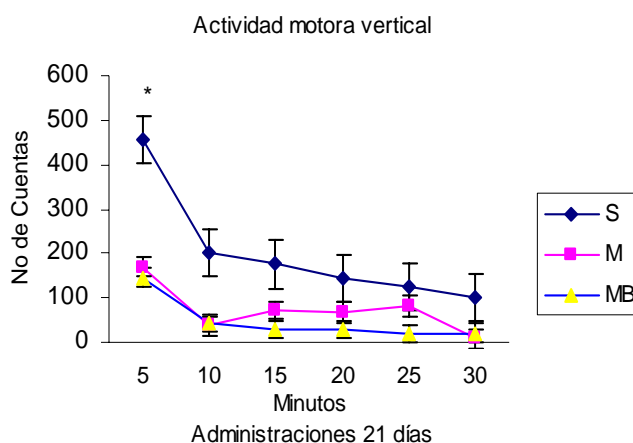


Figura 14. Muestra las medias \pm EEM del número de cuentas de la actividad vertical después del tratamiento crónico con midazolam (M) a diferentes intervalos. $+ p < 0.05$ vs S. MB = Midazolam Bioterio.

Discusión y conclusiones

Los resultados del Experimento 3A, demostraron el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam. Sin embargo, no se demostró el efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam cuando el contexto es manipulado en forma configuracional.

En otros laboratorios se ha demostrado que la exposición crónica a benzodiazepinas produce tolerancia en algunos de los efectos de las benzodiazepinas (Pérez et al., 2002), y que la tasa de desarrollo de la tolerancia varía para los diferentes efectos conductuales de las benzodiazepinas (Fahey et al., 2001). El mayor grado de tolerancia se ha observado a los efectos atáxicos y sedantes, y con poca o nula tolerancia a los

efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas, por ejemplo los estudios de Vellucci y File (1979) encontraron que el clordiazepóxido pierde parte de su acción ansiolítica después de 15 administraciones; File (1981) observó en ratas mayor desarrollo de tolerancia a los efectos sedantes del lorazepam y triazolam; en el estudio de Treit (1985a) se observó el efecto ansiolítico al diazepam en la conducta defensiva de enterramiento después de 10 días de tratamiento. Lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos en este experimento por el grupo crónico D, el cual desarrolló tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam.

Asimismo, los resultados del presente experimento no mostraron el efecto ansiolítico por el grupo de administraciones crónicas en el Bioterio y evaluado en el contexto laboratorio, lo que indica que el cambio de contexto tuvo poco efecto en el desarrollo de la tolerancia condicionada a los efectos ansiolíticos del diazepam; lo que coincide con resultados previos donde la manipulación del contexto con la continua administración de diazepam tuvo poco efecto para mostrar la respuesta condicionada, probablemente debido al corto tiempo de tratamiento de 3 días (Marin, et al., 1999).

En relación a esto, la literatura por un lado reporta diferencias en el aprendizaje de los animales cuando el aprendizaje requiere procesar eventos con múltiples estímulos que ocurren simultáneamente durante el proceso de condicionamiento.

Por otro lado, para algunos animales un estímulo es más saliente que los otros durante el condicionamiento, resultando en un deterioro del aprendizaje de los estímulos debido a la presencia del otro estímulo (Brasser & Spear, 2004). Por último, para otros sujetos la integración de todas las características del ambiente particular que conforma el contexto puede afectar la presencia del desarrollo de la tolerancia (Wolgin, 2000).

En otras palabras, los sujetos de estos experimentos en el caso del diazepam mostraron un deterioro en el aprendizaje, posiblemente debido a los efectos amnésicos que tiene el diazepam, pareciera que estos efectos inhiben el recuerdo del animal acerca de la asociación de los estímulos con las administraciones de la droga, específicamente la función del estímulo condicionado para predecir los efectos de la droga, afectando el recuerdo de la impresión de la integración de las características de los estímulos que

conformaban el contexto donde se realizaron las administraciones. Para el midazolam de acuerdo a los resultados, parece que los sujetos tratados con esta droga discriminan mejor las características del contexto donde se realizaron las administraciones previas de las condiciones de un nuevo contexto donde se realizó la prueba. Lo que hace suponer que el problema puede no ser el contexto, si no que podría deberse a la dosis, la droga y la diferente vida media reportada en la literatura de las drogas usadas en este experimento, ya que se ha reportado que cuando se realizan asociaciones de dosis bajas de la droga con un contexto se desarrolla la tolerancia asociativa como lo reporta la bibliografía (Baker & Tiffany, 1985; Cepeda-Benito & Tiffany, 1995) como sucedió en estos resultados cuyo intervalo fue de 24 hrs y una dosis de 1 mg/kg para el diazepam y que al parecer aunque el intervalo es largo, la dosis no permitió llevar a cabo la discriminación de las condiciones de las características de los estímulos, entre las asociaciones de las administraciones y condiciones de la prueba.

Los resultados del Experimento 3B en donde se aplicó midazolam, apoyan y extienden el modelo de Siegel respecto al efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia, la cual es mayor cuando la prueba se realiza en el mismo contexto que se asoció con las administraciones de la droga (Siegel, Baptista, Kim, McDonald & Weise-Kelly, 2000). Dado que se observó en el grupo de administraciones crónicas de midazolam (M) en el contexto Laboratorio y evaluado en el mismo contexto, el efecto ansiolítico siendo este menor (decremento en el número de entradas a los brazos abiertos), se puede inferir el desarrollo de tolerancia con administraciones de 21 días. Estos resultados coinciden con otros estudios donde también se observa un menor efecto ansiolítico de los sujetos cuando se les evalúa en una prueba de interacción social (File, 1985b; Fernandes & File, 1999; Pellow, et al., 1985) y se reporta ansiedad a los espacios abiertos. Reportes similares de desarrollo de tolerancia se han observado con administraciones de 3 días (File, 1981) y 21 días con midazolam (File, 1993).

Por otro lado, la tolerancia es menor o no se observa si la prueba se realiza en un contexto alternativo a las administraciones iniciales (Baker & Tiffany, 1985; Pérez et al., 2002; Poulos & Cappell, 1991; Siegel, 1975) como se observó en el grupo de administraciones crónicas en el laboratorio y

evaluado en el contexto Bioterio (MB) donde se ve un incremento en el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos; lo cual sugiere el efecto ansiolítico del midazolam, estos datos coinciden con otros reportados por la literatura (Bertoglio & Carobrez, 2002b; Cruz-Morales et al., 2002).

Es importante resaltar que los resultados de la tolerancia condicionada del midazolam fueron dependientes tanto de la dosis (1 mg/kg) como del intervalo (21 días), lo cual concuerda con lo reportado por Cepeda-Benito y Tiffany (1996) y por Baker y Tiffany (1985). Lo que nos hace suponer que el organismo cuenta con tiempo suficiente para asociar los estímulos presentes durante la administración de la droga con los efectos de ésta.

Se concluye que tanto la dosis, el intervalo entre dosis, el tipo de droga y el efecto de la droga a evaluar son variables importantes para demostrar la tolerancia asociativa, para que se presente o no el desarrollo de la tolerancia. Y que es necesario manipular dosis más altas del diazepam, ya que posiblemente facilitaría en mayor magnitud la asociación de sus efectos con el contexto, esperando que cuando los sujetos sean evaluados en un nuevo contexto, diferente al contexto donde se desarrollo tolerancia se presente la ansiólisis en un mayor porcentaje.

Los resultados con el midazolam apoyan y extienden el análisis del condicionamiento de la tolerancia al demostrar la especificidad contextual de la tolerancia. En otras palabras después de que la tolerancia fue establecida por la administración repetida de la droga en un ambiente particular (Laboratorio o Bioterio), la tolerancia generalmente es mas pronunciada (contexto laboratorio) que en un ambiente diferente no asociado con las administraciones de la droga (contexto Bioterio).

Por último, los resultados también demuestran diferencias entre el diazepam y midazolam con dosis de 1 mg/kg, estas diferencias se refieren a su vida media y potencia; ya que el diazepam es una droga de acción larga y menos potente a esta dosis que el midazolam. Con el midazolam (vida media corta) el efecto de contexto fue más evidente, esto es se obtuvo mayor efecto ansiolítico indicado por un mayor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

Experimento 4

12.1 Experimento 4 A

Efecto del flumazenil en el LEC.

Las benzodiazepinas se han clasificado por la acción de sus efectos como: agonistas completos, es decir que imitan las acciones de agentes como el diazepam, su ocupación de los sitios de unión es relativamente baja. Como agonistas parciales; estos producen menos efectos máximos o requieren una ocupación relativamente alta en comparación con agentes como el diazepam. Algunos compuestos tienen efectos opuestos a los del diazepam en ausencia de agonistas del tipo de las benzodiazepinas, y se les denominan agonistas inversos, se reconocen también agonistas inversos parciales. Los efectos de las benzodiazepinas se pueden revertir o prevenir por el antagonista flumazenil, lo que implica mediación por uno o más subtipos de sitios de fijación de las benzodiazepinas. Otros compuestos se comportan como el flumazenil, y su función es bloquear los efectos de los agonistas o de los agonistas inversos. (Hobbs et al., 1998; Julien, 1998; O' Brien, 1996).

Se ha reportado que una sola dosis del flumazenil antagonista de las benzodiazepinas puede revertir el desarrollo de la tolerancia a los efectos de las benzodiazepinas en roedores. Nutt y Costello (1988) reportaron que el flumazenil revierte el incremento de la sensibilidad al receptor agonista inverso de la benzodiazepina. Por otro lado, una dosis de 4 mg/kg de flumazenil revirtió el efecto ansiogénico del etanol (dosis media 11.8 ± 0.2 g/kg por día) en una prueba de interacción social, en esta prueba se colocan pares de ratas en una arena neutral después de que permanecieron alojada individualmente en su caja-hogar y se registra el tiempo de permanencia en interacción social activa, registrándose categorías como olfateo, seguimiento y búsqueda de la pareja. (File, Baldwin & Hitchcott, 1989). El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del flumazenil en el laberinto elevado en cruz.

Procedimiento

Los sujetos se asignaron aleatoriamente a 2 grupos ($n=8$). El primero recibió una administración de 5 mg/kg de flumazenil (F) en el laboratorio, y el segundo recibió una inyección de solución salina (S) en un volumen

equivalente (1 ml/kg). La administración se inicio 30 min antes de la prueba en el LEC.

Resultados

La Figura 15 muestra los promedios por grupos en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos.

Una prueba t-student mostró diferencias no significativas ($p > 0.5$) entre los grupos flumazenil respecto al de salina, No se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo de salina y el de flumazenil a pesar de que el porcentaje de entradas a brazos abiertos fue menor en el grupo de flumazenil respecto al grupo de salina.

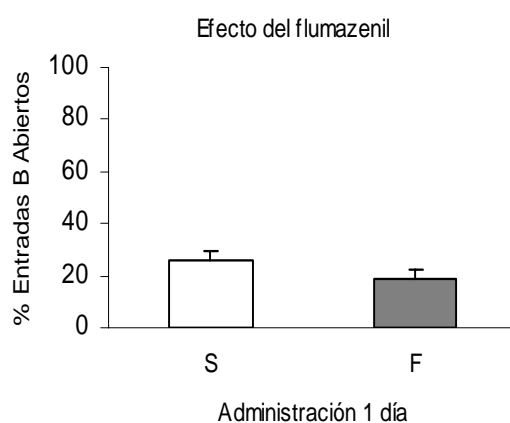


Figura 15. Muestra las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos por grupos. No hubo diferencias significativas. F= Flumazenil laboratorio.

La Figura 16, representa el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. La prueba t no mostró diferencias significativas ($p > 0.5$). Tanto el grupo de S como el de M mostraron porcentajes similares.

12. Experimento 4

12.1 Experimento 4 A

Efecto del flumazenil en el LEC.

Las benzodiazepinas se han clasificado por la acción de sus efectos como: agonistas completos, es decir que imitan las acciones de agentes como el diazepam, su ocupación de los sitios de unión es relativamente baja. Como agonistas parciales; estos producen menos efectos máximos o requieren una ocupación relativamente alta en comparación con agentes como el diazepam. Algunos compuestos tienen efectos opuestos a los del diazepam en ausencia de agonistas del tipo de las benzodiazepinas, y se les denominan agonistas inversos, se reconocen también agonistas inversos parciales. Los efectos de las benzodiazepinas se pueden revertir o prevenir por el antagonista flumazenil, lo que implica mediación por uno o más subtipos de sitios de fijación de las benzodiazepinas. Otros compuestos se comportan como el flumazenil, y su función es bloquear los efectos de los agonistas o de los agonistas inversos. (Hobbs et al., 1998; Julien, 1998; O' Brien, 1996).

Se ha reportado que una sola dosis del flumazenil antagonista de las benzodiazepinas puede revertir el desarrollo de la tolerancia a los efectos de las benzodiazepinas en roedores. Nutt y Costello (1988) reportaron que el flumazenil revierte el incremento de la sensibilidad al receptor agonista inverso de la benzodiazepina. Por otro lado, una dosis de 4 mg/kg de flumazenil revirtió el efecto ansiogénico del etanol (dosis media 11.8 ± 0.2 g/kg por día) en una prueba de interacción social, en esta prueba se colocan pares de ratas en una arena neutral después de que permanecieron alojada individualmente en su caja-hogar y se registra el tiempo de permanencia en interacción social activa, registrándose categorías como olfateo, seguimiento y búsqueda de la pareja. (File, Baldwin & Hitchcott, 1989). El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del flumazenil en el laberinto elevado en cruz.

Procedimiento

Los sujetos se asignaron aleatoriamente a 2 grupos ($n=8$). El primero recibió una administración de 5 mg/kg de flumazenil (F) en el laboratorio, y el segundo recibió una inyección de solución salina (S) en un volumen

11. Experimento 3

11.1 Experimento 3 A

Desarrollo de la tolerancia condicionada configuracional del diazepam

En el experimento previo se observó tolerancia independientemente del contexto, cuando el contexto fue un estímulo discreto (ruido).

Sin embargo hay datos que sugieren un mayor efecto del contexto cuando en lugar de presentar estímulos discretos aislados, se presenta el contexto como un compuesto de estímulos (configuración) observándose un mayor control de este. Existen datos que sugieren que los sujetos perciben el contexto donde se realizan las administraciones de la droga en forma configuracional (Fantino, 2001; Gerlai, 1998; Rescorla & Wagner, 1972). Esto es, los organismos perciben las características de los estímulos que integran el contexto como un compuesto y no en forma aislada. Con base en estos planteamientos, se realizó el Experimento 3 con el objetivo de estudiar el efecto del contexto como un compuesto de estímulos (Laboratorio y Bioterio) sobre el desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam.

Procedimiento

Desarrollo de la tolerancia al diazepam

Los sujetos se asignaron aleatoriamente a 3 grupos ($n=8$). Dos grupos (D y DB) fueron inyectados con 1 mg/kg, ip de diazepam por 20 días (1 por día), el grupo D fue inyectado en el laboratorio y el segundo en el bioterio (DB). El tercer grupo fue inyectado con salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg) en el laboratorio; 30 min después de las administraciones se les regresó a su caja de alojamiento.

Prueba de tolerancia.

El día 21 a los grupos D y DB se les administró en el contexto laboratorio diazepam (1.0 mg/kg, ip) y al tercer grupo S se le administró solución salina en un volumen equivalente en el mismo contexto, siguiendo el mismo procedimiento que en la Fase I. Se colocó a cada sujeto en el laberinto elevado en cruz durante 5 minutos, se grabó la sesión y posteriormente se registraron los diferentes parámetros conductuales. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto fue trasladado al cuarto donde se encontraba la caja de

10. Experimento 2

10.1 Experimento 2 A

Desarrollo de tolerancia condicionada al diazepam

Existe evidencia que muestra que la tolerancia farmacológica no es la sola consecuencia inevitable de las administraciones repetidas de una droga, sino que su manifestación se ve influida por los mecanismos de aprendizaje que pueden influir en la adquisición y desarrollo de tolerancia hacia las drogas mediante el condicionamiento clásico (Larson & Siegel, 1998; Melchior & Tobakoff, 1985; y Siegel, 1977). Estos autores señalan que la tolerancia se presenta a su máximo sólo cuando al organismo se le administra la droga en presencia de señales que anteriormente habían estado presentes en el momento de la aplicación de la droga.

Asimismo se ha reportado que benzodiazepinas como el diazepam y midazolam desarrollan tolerancia farmacológica con exposiciones de 15 a 20 días (File, 1985b). Sin embargo no se han realizado estudios donde se evalúe el efecto del contexto al efecto ansiolítico de ambas benzodiazepinas en el LEC. Por lo que el objetivo de este experimento fue evaluar si el contexto como un estímulo discreto (ruido) afecta el desarrollo de la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam con exposiciones de 21 días a ambas drogas.

Procedimiento

Los sujetos fueron asignados al azar en tres grupos ($n=8$). Estos grupos recibieron 20 días de administraciones 1 por día, en dosis de un 1 mg/kg, ip en el contexto laboratorio. Dos grupos recibieron administraciones crónicas de diazepam (D) y el tercer grupo recibió tratamientos crónicos con salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg).

Prueba de tolerancia.

Las pruebas para evaluar el desarrollo de tolerancia al diazepam en el LEC, se realizaron el día 21 en el laboratorio 30 minutos después de la administración del diazepam, indicada por un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

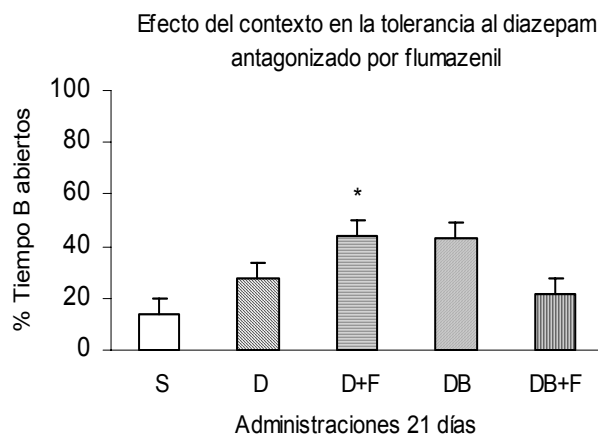


Figura. 18. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos con administraciones crónicas:
* $p < 0.05$ vs S.
D+F = Diazepam con Flumazenil en el laboratorio
DB+F = Diazepam con Flumazenil en el bioterio

No se encontraron diferencias significativas en el total de entradas a los brazos, lo que sugiere que los tratamientos no afectaron la actividad locomotora de los sujetos ($p > 0.05$). Lo que coincide con los resultados en actividad motora horizontal dado que no se obtuvieron diferencias estadísticas de interacción tratamiento/tiempo.

Sin embargo, en la Figura 19 se observan diferencias significativas en la interacción tratamiento/tiempo en la actividad vertical ($F_{(4,34)} = 6.94$; $p < 0.01$). La prueba Tukey mostró que todos los grupos de Diazepam muestran menor actividad en los primeros 10 min comparados con el grupo de S.

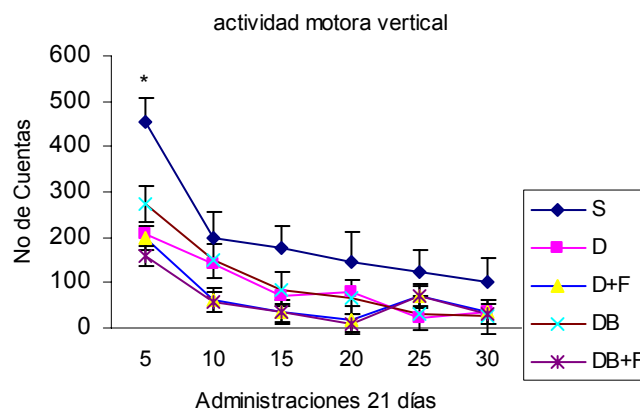


Figura 19. Muestra las medias \pm EEM de la actividad vertical después del tratamiento crónico de diazepam (D) a diferentes intervalos.
* $p < 0.05$ vs. S. D+F = Diazepam más Flumazenil laboratorio
DB+F = Diazepam más Flumazenil bioterio

13.2 Experimento 5 B

Efecto del flumazenil en la tolerancia asociativa al midazolam

El objetivo de este experimento fue estudiar si el flumazenil puede revertir el efecto de contexto en la tolerancia al efecto ansiolítico del midazolam.

Procedimiento

Los sujetos se asignaron aleatoriamente a 5 grupos ($n=8$). El procedimiento que se siguió fue el mismo del Experimento 5 A, excepto que en lugar de administrar diazepam se administró midazolam 1 mg/kg.

Prueba de la reversión al efecto ansiolítico por el flumazenil

El día 21 los 5 grupos crónicos fueron evaluados en el LEC en el laboratorio, a los grupos M y MB se les administró midazolam, al grupo S se le administró solución salina en un volumen equivalente a la dosis de las benzodiazepinas y a los grupos M+F y MB+F se les administró flumazenil, las administraciones de este fármaco se realizaron ip. Cabe aclarar que primero se administró el flumazenil y 15 min después el midazolam, 15 min después de la administración se les probó en el laberinto durante 5 min y se registró el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos del laberinto y el número de entradas.

Resultados

La Figura 20 representa los promedios del porcentaje de entradas a los brazos abiertos, observándose la reversión de la tolerancia al midazolam por el flumazenil

Un ANOVA de una vía (tratamiento) mostró diferencias significativas en el porcentaje de entradas a brazos abiertos entre grupos ($F_{(4,33)}=6.26$; $p<.001$).

Con la prueba Tukey se detectó que el grupo tratado con salina (S) difirió significativamente de los grupos M+F ($p< 0.001$) y MB ($p< 0.05$). Es decir los grupos tratados crónicamente con midazolam y el día de la prueba probados con flumazenil (M+F) o en un contexto distinto al de las administraciones crónicas (MB) mostraron un efecto ansiolítico (incremento en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos). En el primer caso el flumazenil revertió la

tolerancia, y el segundo caso el cambio de contexto cancelo la tolerancia. El que no se detectaran diferencias entre el grupo S y los grupos M y MB+F, sugiere en el primer caso el desarrollo de tolerancia en el grupo M que recibió las administraciones y fue evaluado en mismo contexto, mientras que con el grupo MB+F la administración de flumazenil en el grupo de midazolam con administraciones y prueba en un nuevo contexto se presentó el efecto del cambio de contexto, indicado por un menor porcentaje en el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos.

El grupo tratado en el bioterio con midazolam y evaluado en el laboratorio con una administración de flumazenil (MB+F) mostró diferencias significativas con respecto al grupo MB de administraciones crónicas con midazolam en el bioterio y evaluado en el laboratorio con midazolam ($p < 0.01$), esto sugiere la reversión de la tolerancia de tipo asociativa por el flumazenil, indicado por un decremento en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos comparado con la ejecución del grupo MB, en el cual se observa el efecto de contexto en un incremento en ésta medida.

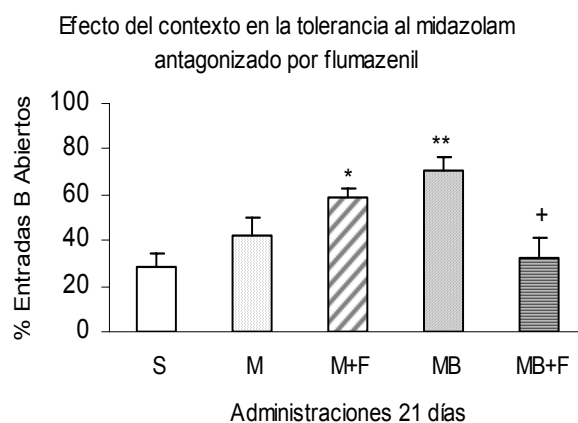


Figura 20. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs S; + $p < 0.01$ vs MB. M+F = Midazolam más Flumazenil laboratorio MB+F = Midazolam más Flumazenil bioterio.

La Figura 21 representa el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. Un ANOVA de una vía (tratamiento) mostró diferencias significativas ($F_{(4,33)} = 15.35$; $p < .0001$).

La prueba Tukey mostró que el grupo S difiere significativamente del grupo tratado con midazolam en el laboratorio y evaluado en el mismo contexto con flumazenil (M+F $p < 0.0001$) y del grupo con administraciones crónicas en el bioterio y evaluado en el laboratorio con midazolam (MB $p < 0.0001$). El grupo con midazolam y flumazenil (M+F) difirió del grupo con administraciones crónicas en el laboratorio y evaluado en un nuevo contexto con midazolam (MB $p < 0.0001$). Éste mismo grupo MB difirió del grupo tratado y evaluado con midazolam en el mismo contexto (M $p < 0.0001$) obteniéndose el efecto del contexto, mostrado por un mayor porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. Respecto al grupo MB+F tratado en el bioterio con midazolam y evaluado con midazolam+flumazenil en un contexto diferente (laboratorio) fue estadísticamente diferente del grupo M+F ($p < 0.001$) y del grupo MB ($p < 0.001$) presentándose el efecto de contexto.

Los resultados demostraron el desarrollo de la tolerancia del midazolam (M) dependiente del contexto, la tolerancia fue mayor cuando los sujetos fueron evaluados en el mismo contexto de administraciones previas. No se detectó tolerancia cuando se les probó en un contexto diferente. Cuando se administró midazolam+flumazenil al grupo (M+F) en el mismo contexto de sus administraciones previas antes de la prueba se antagonizó la tolerancia al midazolam. Y con el grupo MB+F que se le evaluó en un contexto diferente al de sus administraciones, el flumazenil antagonizó el efecto ansiolítico del midazolam.

Como puede observarse los resultados muestran que el flumazenil puede disminuir el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas, pero este efecto es específico al contexto en el cual se desarrolló la tolerancia al fármaco.

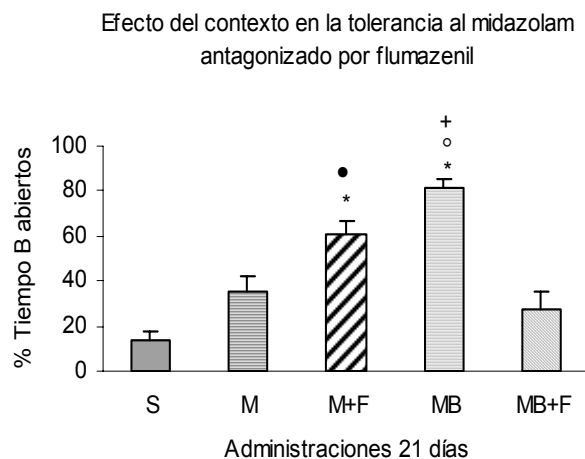


Figura 21. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. * $p < 0.0001$ vs S; + $p < 0.0001$ vs M; • $p < 0.001$ ° $p < 0.01$ vs MB+F. M+F = Midazolam más flumazenil laboratorio MB+F = Midazolam más flumazenil bioterio.

En el total de entradas no hubo diferencias significativas.

La Figura 22 representa la actividad motora vertical, se obtuvieron diferencias significativas ($F_{(4,32)} = 7.57$; $p < 0.001$) en la interacción tratamiento/tiempo de la actividad vertical. La prueba Tukey mostró diferencias significativas del grupo salina (S) respecto a todos los grupos ($p < 0.001$), el mayor efecto se observa en los primeros 10 min, posteriormente se observa poca actividad respecto al grupo salina presentándose el efecto de habituación por el paso del tiempo. En la actividad motora horizontal no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.5$).

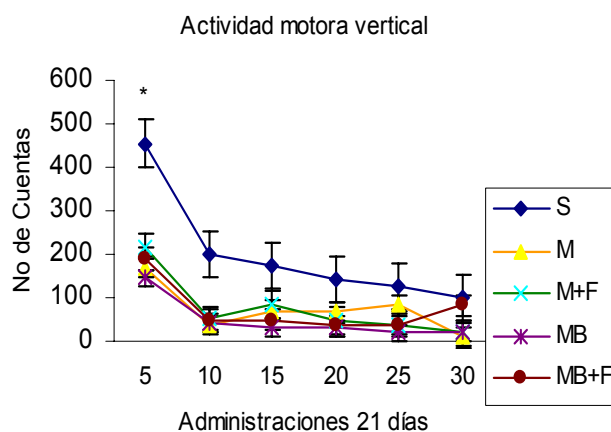


Figura 22. Muestra la media \pm EEM de la actividad vertical, después del tratamiento crónico de midazolam (M) a diferentes intervalos. * $p < 0.05$ vs. S. M+F = Midazolam más Flumazenil laboratorio MB+F = Midazolam más Flumazenil bioterio

Discusión y conclusiones

Los resultados mostraron que la administración de flumazenil previno la manifestación de la tolerancia del efecto ansiolítico del diazepam cuando se evalúa en el contexto asociado con la administración de la droga. Se mostró la importancia del contexto al evaluarse a los sujetos en un contexto diferente al de su historia farmacológica, obteniéndose una menor tolerancia al diazepam comparado con lo observado en los grupos evaluados en el mismo contexto, lo cual está de acuerdo con la literatura (Duncan et al., 2000; Pérez et al., 2002; Siegel, 1975, Smith, 1990). Lo que implica la importancia del contexto en el desarrollo y reducción de la tolerancia. Estos resultados están de acuerdo con investigaciones donde se ha reportado que los sujetos cuando son evaluados en contextos que se conforman de varios estímulos, lo perciben como la suma de todos y no como estímulos aislados (Pickens & Holland, 2004, Wolgin, 2000) o selectivos (Fantino, 2001). Por último, se demostró que el efecto del contexto puede ser antagonizado por el flumazenil (MB vs MB+F). Al igual que con el diazepam, el midazolam desarrolló tolerancia dependiente del contexto a su efecto ansiolítico midazolam. Los resultados del midazolam fueron más pronunciados que los del diazepam, quizás esto se deba a la diferente vida media de ambas benzodiazepinas, la vida media del diazepam es de aproximadamente de 0.88 a 1.0 hr y su vida media de eliminación de 1.1 hr en ratas (ver revisión de Hutchinson et al., 1996), en tanto la acción del midazolam es más rápida debido a la rapidez de su absorción. En términos asociativos estos resultados refuerzan los planteamientos de Balsam (1985) de que todo aprendizaje ocurre en un contexto de tipo asociativo, los de Baker y Tiffany (1985) de que la tolerancia es mediada por procesos asociativos y de Pickens y Holland (2004) que la asociación entre dos estímulos, se facilita cuando las asociaciones entre estos son repetidos por varios ensayos, lo cual facilita el condicionamiento de la representación configuracional de los estímulos del contexto. Asimismo, la tolerancia condicionada a los efectos ansiolíticos del midazolam fueron antagonizados por el flumazenil, siendo más robusto el efecto en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. Por lo que queda de manifiesto que una sola dosis de flumazenil revierte el efecto del midazolam. Por ejemplo, se ha demostrado que el flumazenil previene el síndrome de abstinencia al clordizapóxido (Baldwin & File, 1989), y previene la respuesta de

abstinencia al etanol en la prueba de interacción social (File, et al., 1989), antagoniza el efecto inhibitorio del midazolam en la transmisión de las neuronas en el complejo trigémino cervical (Storer, Akerman, Shields & Goadsby, 2004).

En este experimento se demostró que la tolerancia al efecto ansiolítico de las benzodiazepinas fue bloqueada por el flumazenil, lo que podría explicarse por la alta afinidad a los sitios de unión de las benzodiazepinas y a su menor eliminación del cerebro que del plasma. Por ejemplo, en un estudio donde se demuestra la reversión del efecto de sedación inducido por el diazepam, los autores proponen que esta reversión podría ser el resultado de una lenta eliminación del cerebro de este compuesto (Lister, Greenblatt, Abernethy & File, 1984). Ya que el diazepam y midazolam tienen su efecto en la transmisión GABAérgica por medio de la modulación del receptor GABA_A, estos datos son consistentes con reportes previos que resaltan la importancia de la transmisión GABA_A (Storer, et al., 2004). Por otro lado, la exposición crónica de las dos benzodiazepinas provoca alteraciones en la neurotransmisión GABAérgica que contribuye a los efectos de tolerancia. Sin embargo, el mecanismo o mecanismos de este fenómeno no son claros (Bateson, 2002). Se piensa que tanto la dosis así como la duración del tratamiento están relacionadas, bajo estos supuestos el flumazenil antagonista de las benzodiazepinas, al parecer bloqueó la tolerancia ansiolítica desarrollada por las benzodiazepinas, restaurando la alteración en la neurotransmisión GABAérgica que fue provocada por el tratamiento crónico de las benzodiazepinas, y al parecer se relaciona con una reducción en la potenciación de la respuesta GABA por la aplicación aguda del flumazenil siguiendo a la exposición crónica de las benzodiazepinas. Por lo que los receptores tratados crónicamente son menos sensibles a un cambio agudo.

Los resultados de este experimento, indican que el sólo cambio de contexto es suficiente para reactivar el efecto ansiolítico de las benzodiazepinas, este efecto parece ser de tipo farmacológico, y algunos investigadores (Malizia & Nutt, 1995) lo han relacionado con una restauración a su estado original, por lo que el flumazenil puede ser capaz de minimizar el efecto ansiolítico del midazolam que se presenta cuando es probado en un contexto diferente.

En la actividad motora se observó una disminución como resultado de la habituación a la nueva situación (caja de actividad motora) tanto en actividad motora vertical como horizontal. En general no se encontraron cambios, por el efecto de los fármacos, excepto en la actividad motora vertical, donde se observó disminución en los primeros 10 min con respecto al grupo de salina. Es importante resaltar que en algunos casos la actividad motora vertical es menor en los primeros 10 min con respecto al grupo salina, esto podría deberse a que los sujetos aún se encontraban bajo los efectos de los fármacos, lo cual no es consistente con los resultados obtenidos en el número total de entradas; o bien a que el grupo de salina muestra una actividad mayor, lo cual es lo más probable, debido a diferencias en el procedimiento (cambios de luz que se presentaron en el momento de la prueba de actividad motora debido a una falla eléctrica), dado que este grupo en particular mostró mas actividad que los grupos de salina con administración aguda, sin embargo esto no parece ser debido a la diferencia entre administración aguda y crónica, ya que los otros grupos también fueron tratados crónicamente.

En general en todos los grupos evaluados a lo largo del tiempo se ve una disminución en ambas actividades debido a la habituación al aparato de prueba.

Se concluye que el contexto es una variable muy importante en el desarrollo de la tolerancia, ya que los resultados indican que la percepción del contexto donde se administraron las drogas por los animales fue configuracional. También, que la tolerancia y el efecto del contexto pueden ser revertidos por el flumazenil. Los resultados de estos experimentos demostraron que la magnitud del desarrollo de la tolerancia fue dependiente del contexto donde se les probó, ya que al probarse en un contexto diferente al de su historia farmacológica el efecto ansiolítico del midazolam persiste, comparado con el que se prueba en el mismo contexto donde recibió el tratamiento, el efecto ansiolítico ya no es evidente.

14. Experimento 6

14.1 Experimento 6 A

Efecto del etanol en el LEC.

El etanol es una droga de las más consumidas entre la población y uno de sus efectos es ansiolítico al igual que el midazolam y diazepam a dosis bajas. Por otro lado, se ha descrito que la tolerancia cruzada se presenta a otra droga que tiene efectos similares. Por lo cual el objetivo de este experimento, fue demostrar el efecto ansiolítico del etanol con una dosis de 1.5 g/kg.

Procedimiento

A un grupo se le administró etanol (E) en una dosis de 1.5 g/kg de una solución al 20 % y a otro grupo solución salina (S) en un volumen equivalente de 1 ml/kg para evaluar el efecto ansiolítico del etanol en el LEC.

Resultados

La Figura 23, muestra los promedios del porcentaje de entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos del efecto ansiolítico del etanol, este efecto fue estadísticamente significativo al aplicarse una prueba t comparado con el grupo de salina ($p < 0.01$), observándose el efecto ansiolítico del etanol en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos.

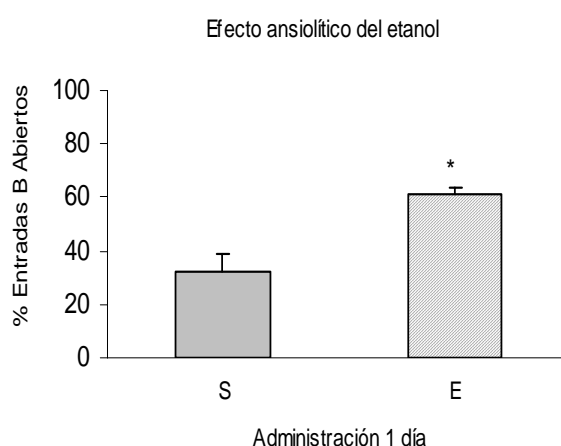


Figura 23. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos por grupos. * $p < 0.001$ vs S.

La Figura 24 muestra que en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos, se obtuvieron diferencias significativas con la prueba t ($p < .001$) al compararse el grupo E contra el grupo S. El efecto ansiolítico del etanol fue indicado por un mayor porcentaje de tiempo de permanencia a los brazos abiertos, comparado con el grupo salina el cual mostró menor porcentaje.

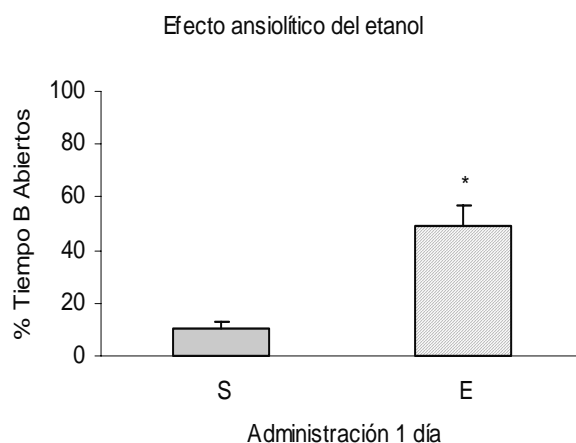


Figura 24. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. * $p < 0.001$ vs S. S = salina y E = etanol en el laboratorio.

En la medida del total de entradas se obtuvieron diferencias significativas al aplicarse una prueba t ($p < 0.05$), lo que indica que el tratamiento de etanol afecta la actividad motora.

Respecto a la prueba de actividad motora no se obtuvo la interacción de los factores tratamiento /tiempo ni en la actividad horizontal ni en la vertical en los animales ($F_{(5,70)} = 1.59$; $p > 0.5$).

Discusión y conclusiones

Los resultados de este experimento demostraron que el etanol tiene un efecto ansiolítico en el LEC. Es importante mencionar que tanto el etanol como las benzodiazepinas tienen efectos depresores en el SNC y, dependiendo de la dosis, producen sedación, este efecto disminuye la actividad, también tiene propiedades hipnóticas y ansiolíticas.

En estos resultados también se demostró el efecto ansiolítico al etanol a una dosis baja en la prueba del LEC, lo cual está de acuerdo a lo reportado por Bertoglio y Carobrez (2002b) que utilizaron una dosis de 1.5 g/kg. Es

importante resaltar que con esta dosis no se presentó el efecto de sedación, no afectando la actividad del animal, esto fue corroborado en la prueba de actividad motora, ya que no fueron afectadas ni la actividad vertical ni la actividad horizontal.

15. Experimento 7

15.1 Experimento 7 A

Efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia cruzada diazepam-etanol

La tolerancia cruzada a dos drogas, es el fenómeno donde un organismo muestra un decremento en la respuesta a una droga como consecuencia de tratamientos previos con otras drogas. Se ha observado que este fenómeno también es afectado por el contexto en la tolerancia cruzada a los efectos de sedación (Cappell, Roach & Poulos, 1981; Melchior & Tobakoff, 1985, Vila & Cedillo, 1991), hipotermia (Cedillo, 2001), etc., del etanol, pero a sus efectos ansiolíticos no se ha reportado la tolerancia cruzada con la prueba en el LEC. Por lo que el objetivo de este experimento, fue demostrar la relevancia del contexto en el desarrollo de la tolerancia cruzada diazepam-etanol al efecto ansiolítico, evaluado en el LEC.

Procedimiento

Los sujetos fueron asignados al azar a 3 grupos ($n=8$). El primer grupo recibió diazepam durante 20 días en el contexto laboratorio y el día 21 se realizó la prueba de tolerancia cruzada y se le administró etanol (D+E); el segundo grupo recibió 20 administraciones de diazepam en el contexto bioterio y el día 21 fue inyectado con etanol en el laboratorio (DB+E); el grupo de salina recibió 20 administraciones de solución salina en el contexto laboratorio y el día 21 se le probó con salina en este contexto, 30 min después de la administración del fármaco o de salina se regresaron a sus cajas hogar y a su cuarto de alojamiento, excepto el día de la prueba donde se expusieron al LEC e inmediatamente después se evaluó la actividad motora, siguiendo el procedimiento de registro y análisis que en el Experimento 1.

Resultados

La Figura 25, muestra los resultados del desarrollo de tolerancia cruzada del efecto ansiolítico del diazepam-etanol en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos. Obteniéndose diferencias significativas al aplicarse un ANOVA para el factor tratamiento ($F_{(2,21)}=11.85$; $p < 0.001$).

Las comparaciones entre grupos mostraron diferencias significativas del grupo de administraciones crónicas de diazepam y evaluado con etanol en un contexto diferente al de sus administraciones previas (DB+E) respecto a los grupos evaluados en el mismo contexto de sus administraciones (S y D+E) ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente).

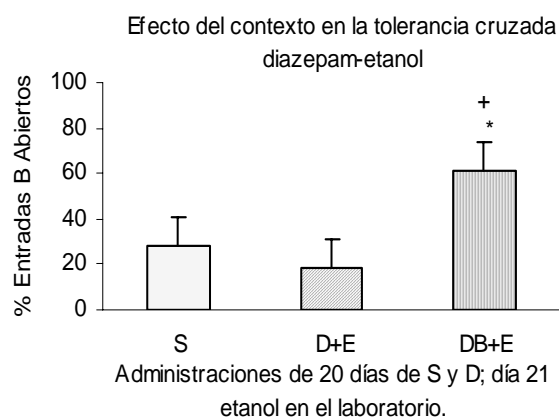


Figura 25. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos por grupos. * $p < 0.01$ vs S y + $p < 0.001$ vs D+E. D+E = Diazepam más Etanol laboratorio DB+E = Diazepam más Etanol bioterio.

En la Figura 26 se presenta el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos, se observa el desarrollo de tolerancia cruzada al etanol dependiente del contexto. Un ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas en el factor tratamiento ($F_{(2,21)} = 33.37$; $p < 0.0001$). Las comparaciones mostraron diferencias de los grupos S y del grupo que se le evaluó en el mismo contexto donde recibió las administraciones crónicas (D+E), respecto al grupo que se le probó en un contexto diferente al de sus administraciones previas, (DB+E; $p < 0.0001$). En otras palabras el grupo DB+E mostró un efecto ansiolítico mientras el D+E mostró el desarrollo de tolerancia.

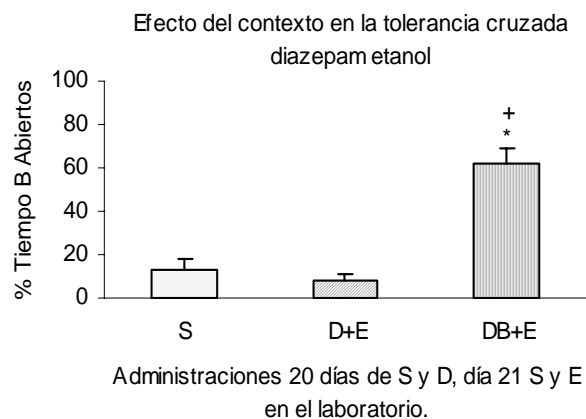


Figura 26. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. * $p < 0.0001$ vs S y + $p < 0.0001$ vs D+E. D+E = Diazepam más Etanol laboratorio DB+E = Diazepam más Etanol bioterio.

Respecto al total de entradas no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.5$) entre grupos, lo que indica que el tratamiento no afectó la actividad motora.

En la actividad motora horizontal y vertical no se detectaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la interacción entre los factores tratamiento/tiempo, por lo que se puede inferir que el tratamiento farmacológico no afecta la actividad motora del animal en esta prueba.

15. 2 Experimento 7 B

Efecto del contexto en el desarrollo de tolerancia cruzada midazolam-etanol.

Procedimiento

Se siguió el mismo procedimiento que en el experimento donde se administró diazepam, a excepción de que se administró midazolam en lugar de diazepam. Y la prueba en el LEC se realizó 15 min después de la administración del etanol.

Resultados

La Figura 27 muestra los promedios del porcentaje de entradas a brazos abiertos de los grupos por tratamiento. Un ANOVA de una vía (tratamiento) demostró diferencias significativas al compararse los grupos en el porcentaje de entradas a brazos abiertos ($F_{(2,21)} = 16.17$; $p < 0.0001$).

Al hacerse las comparaciones con la prueba Tukey se detectó que el grupo crónico de midazolam evaluado en un contexto diferente con etanol (MB+E) difirió del grupo S y del grupo M+E ($p < 0.001$), obteniéndose el efecto de contexto en la tolerancia cruzada a los efectos ansiolíticos del midazolam-etanol.

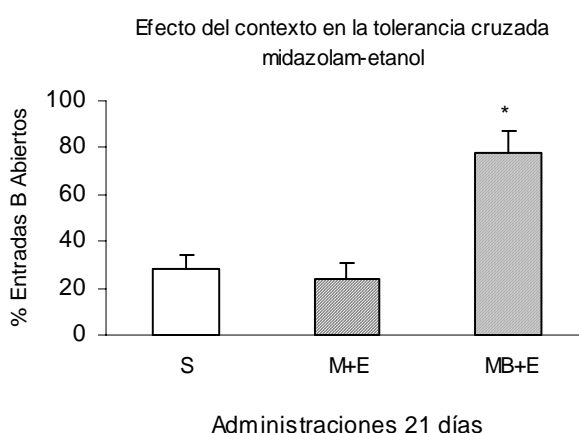


Figura 27. Muestra las medias \pm EEM del porcentaje de entradas a brazos abiertos. * $p < .0001$ vs S y M+E. M+E = Midazolam más Etanol laboratorio, MB+E = Midazolam más Etanol bioterio.

En el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos también se encontraron diferencias significativas ($F_{(21,21)} = 24.13$; $p < 0.001$).

La Figura 28 representa los promedios del porcentaje de tiempo en brazos abiertos por grupos y tratamiento. Se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo de administraciones crónicas en el contexto bioterio y evaluado en un contexto alternativo (Laboratorio) con etanol (MB+E), del grupo de administraciones crónicas de salina ($p < 0.0001$) y del grupo de administraciones crónicas de midazolam en laboratorio y evaluado en el mismo contexto con etanol (M+E; $p < 0.0001$). Lo que significa que los sujetos del grupo (M+E) permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos esto es, desarrollaron tolerancia cruzada al etanol. Por otro lado, el grupo MB+E

mostró el efecto ansiolítico indicado por un mayor porcentaje de permanencia en los brazos abiertos.

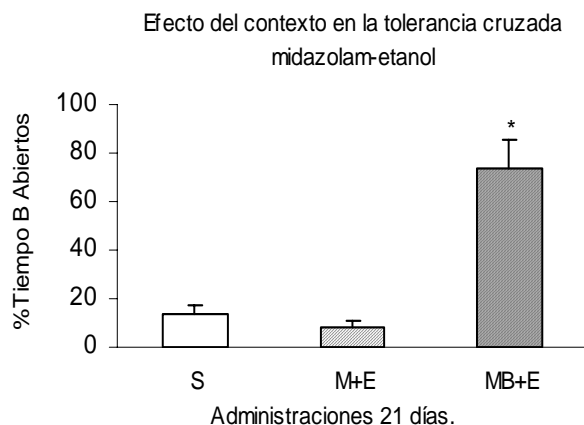


Figura 28. Representa las medias \pm EEM del porcentaje de tiempo en brazos abiertos. * $p < 0.0001$ vs S y M+E. M+E = Midazolam más Etanol laboratorio, MB+E = Midazolam más Etanol bioterio.

En el total de entradas no se obtuvieron diferencias significativas, lo que indica que el tratamiento no afectó la actividad exploratoria de los sujetos. En la actividad motora horizontal y vertical no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la interacción tratamiento/tiempo ($p > 0.05$).

Discusión y conclusiones

Los resultados mostraron el efecto ansiolítico del etanol y el efecto del contexto en el desarrollo de tolerancia cruzada diazepam-etanol en ambas medidas.

Lo importante de estos resultados es que demostraron que el contexto puede controlar la presencia y ausencia del desarrollo de la tolerancia, cuando las señales presentes durante las administraciones repetidas del diazepam, se presentan durante la prueba con etanol en el LEC. Los resultados apoyan los planteamientos de la relevancia de las señales asociadas con la administración de la droga (Le, et al., 1979), ya que al parecer éstas facilitan la información adquirida durante la asociación con el diazepam. De igual forma apoyan la idea de que los estímulos que dan información sobre un evento facilitan el

aprendizaje (Skinner, 1938). Nuestros resultados refuerzan los planteamientos de que se presenta mayor tolerancia (menor porcentaje en el número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos) cuando las señales (contexto) que se asociaron con las administraciones de la droga estuvieron presentes, que cuando éstas estuvieron ausentes no se obtuvo la tolerancia; en este caso, facilitaron el desarrollo de tolerancia cruzada al etanol. Y por otro lado, cuando éstas señales están ausentes durante la fase de prueba no se presenta tolerancia cruzada al etanol, sino el efecto ansiolítico, estos datos coinciden con previos reportes donde se demuestra el papel del contexto en la tolerancia a los efectos hipotérmicos del etanol (Crowel, Hinson & Siegel (1981). En otras palabras el grupo D+E desarrolló tolerancia y el grupo DB+E al evaluársele en un nuevo contexto no mostró tolerancia al diazepam, si no un efecto ansiolítico como resultado del cambio de contexto. La obtención del desarrollo de la tolerancia cruzada D+E, también se debe a que ambas drogas tienen efectos similares y pareciera que el etanol potencia los efectos ansiolíticos del diazepam, resultando en la prueba del LEC un mayor porcentaje tanto en las entradas como en el tiempo en los brazos abiertos. Probablemente esto se deba a que el etanol actúa en parte a través de los receptores GABA_a, por lo que parecen compartir mecanismos comunes.

Los resultados indican que se llevó a cabo una asociación entre señales y los efectos de la droga durante su administración, resultando que la tolerancia fue dependiente del aprendizaje a todas las señales presentes durante las administraciones de la droga lo cual apoya los hallazgos de Baker y Tiffany (1985) y los de Poulos y Cappell (1991).

Estos resultados también demostraron el desarrollo de tolerancia cruzada midazolam-etanol, indicado por un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos, cuando los sujetos fueron evaluados en mismo contexto de asociaciones con la administración del midazolam, esta tolerancia fue más pronunciada que con diazepam. Un efecto opuesto (mayor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos) se observó en el grupo de administraciones crónicas con midazolam en el contexto Bioterio y evaluado con etanol en un contexto diferente (Laboratorio) lo cual refuerza los planteamientos sobre la relevancia del

contexto en la adquisición, decremento o pérdida de la tolerancia (Siegel, 1975).

Algo interesante que se obtuvo, es que tanto con diazepam como con midazolam se observó tolerancia cruzada al etanol. Este efecto refuerza y extiende los resultados del modelo de tolerancia de tipo asociativo, porque de acuerdo a los resultados, las ratas aprendieron a asociar que ante el contexto Laboratorio (EC) los efectos de la droga (EI) se presentaban por las administraciones de la droga correspondiente (Pavlov, 1927), el modelo de Siegel y el modelo de Baker & Tiffany (1985) a la tolerancia cruzada del diazepam al etanol, esto es, que se llevó a cabo una asociación entre señales y los efectos de la droga durante la inducción de ésta. Es importante señalar que el efecto de contexto fue más pronunciado con el midazolam en la prueba en el LEC, posiblemente a que es una droga más potente y de vida media corta, su efecto lo alcanza en pocos minutos, en tanto que el diazepam tiene una vida media larga y su efecto es más gradual con la dosis tratada (1 mg/kg).

Por último, el número total de entradas a brazos abiertos y cerrados, que es considerado un índice de la actividad motora en la prueba de LEC, no se vio modificado por los tratamientos farmacológicos. Lo que fue corroborado en la prueba de actividad motora, el efecto del fármaco fue disminuyendo conforme pasaba el tiempo de la prueba, observándose el proceso de habituación (Weiss, Wadsworth, Fletcher & Dourish, 1998).

Se concluye que el efecto del contexto, se puede observar en el desarrollo de la tolerancia cruzada de ambas benzodiazepinas al etanol a una dosis baja de 1.5 g/kg. Estos resultados apoyan y extienden los planteamientos del modelo de tolerancia de Siegel con condicionamiento clásico en relación a los principios del condicionamiento asociativo que son aplicables en la evaluación de los efectos ansiolíticos tanto del etanol como del diazepam y midazolam en el LEC en estos experimentos.

Discusión General

Los resultados de estos experimentos cumplieron con los objetivos planteados, en cuanto a evaluar el efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam y midazolam, evaluar el efecto del antagonista flumazenil sobre la tolerancia condicionada, y la evaluación del desarrollo de tolerancia cruzada de estas benzodiazepinas al etanol.

En individuos adictos, normalmente las recaídas del consumo de una droga se producen cuando las personas se exponen a situaciones en las cuales tradicionalmente han consumido esa droga (Beck, Wright, Newman & Liese, 1999). Al relacionar estos hallazgos con la evidencia de la participación del condicionamiento clásico en el desarrollo de la respuesta de tolerancia, se observa que cuando un organismo consume drogas en situaciones específicas (contexto), éstas se asocian a los efectos de la droga. Por lo que se infiere que al exponerse a tales estímulos que integran el contexto, estos estímulos predicen la probabilidad de la ocurrencia de la droga y como consecuencia aumenta la probabilidad de la recaída del sujeto al consumo de ésta.

El primer experimento demostró el efecto ansiolítico del diazepam y midazolam con una dosis de 1 mg/kg. Otras investigaciones reportan este efecto con dosis más altas de diazepam (2 mg/kg) (Fernandes & File, 1999) y con 5 mg/kg (Stephens & Schneider, 1985). Este efecto ansiolítico se manifiesta con un aumento en el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos del LEC.

Por otro lado, la administración por 21 días de diazepam o midazolam indujo tolerancia independientemente del contexto, cuando el contexto consistió de la presentación de un estímulo discreto (ruido blanco, R). En ambos casos la tolerancia se reflejó en un menor porcentaje de entradas y tiempo de permanencia a los brazos abiertos, estos resultados concuerdan con lo reportado por Pérez et al., (2002) en relación a la disminución de los signos de ansiedad durante la administración del diazepam ante diferentes señales a las asociadas con la droga. Cuando el cambio de contexto fue configuracional (laboratorio versus bioterio) la tolerancia fue dependiente del contexto sólo en el caso del midazolam. En estos resultados, el EC contexto (Laboratorio) que estuvo presente durante las administraciones de ambas benzodiazepinas, al

parecer deterioró la integración del nuevo estímulo ruido, por lo que se infiere, que el estímulo discreto (ruido) no fue lo suficientemente saliente como para alterar significativamente el desarrollo de la tolerancia. Una posible explicación a esto, es que el estímulo discreto (ruido) tuvo que competir con los estímulos presentes (configuracional) durante la asociación con la administración de la droga, deteriorando el efecto del contexto, lo cual está de acuerdo con los planteamientos de Brassler y Spear (2004), tal efecto no permitió apreciar la magnitud de la RC de tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam en la prueba del LEC.

Es importante señalar que el desarrollo de tolerancia a las benzodiazepinas se presenta a diferentes efectos, dosis, y número de administraciones; por ejemplo el efecto de relajación muscular se presenta después de administraciones de 5-10 días con dosis de 50-100 mg/kg de clordiazepóxido, este mismo efecto se obtiene con dosis de 100-150 mg/kg con administraciones de 4 semanas de flurazepam. En tanto el efecto atáxico se reporta con tratamiento de flurazepam con dosis de 2-20 mg/kg por periodos de 2-14 días. Respecto a la actividad motora, se ha reportado el desarrollo de tolerancia al efecto de sedación con administraciones de 2-14 días con dosis de 5-150 mg/kg de clordiazepóxido. Los efectos anticonvulsivos se presentan con diferentes drogas, por ejemplo con el clobazam se presentan con dosis de 2.5-10 mg/kg con administraciones de 3-10 días; con el diazepam con dosis de 0.25- 5 mg/kg con tratamientos de 7- 21 días; con midazolam con dosis de 0.75 y 40 mg/kg con administraciones de 7-21 días (ver revisión de Hutchinson et al., 1996).

En esta misma revisión se menciona que el decremento al efecto ansiolítico indica el desarrollo de tolerancia por la continua administración de las benzodiazepinas, los resultados de los estudios indican discrepancias, ya que se ha demostrado la tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam con dosis de 1-20 mg/kg después de administraciones de 4 a 9 días; con clordiazepóxido con dosis de 5-30 mg/kg con tratamientos de 5- 25 días, lo cual concuerda con los resultados del presente experimento. Así mismo, Rodgers y Shepherd (1993) y Stephens y Schneider (1985) reportaron tolerancia al efecto ansiolítico con tratamientos de diazepam 2-4, 5 mg/kg de 2 a 8 días en el LEC y four-plate test respectivamente. En otros estudios, no se demostró el desarrollo de

tolerancia al diazepam con dosis de 1-5 mg/kg con administraciones de 9- 21 días. Por lo que el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas es menos clara que a los efectos atáxicos, relajantes, anticonvulsivos, actividad motora en general y los factores que incrementan la probabilidad del desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos son la vida media larga, dosis altas y la administración continua, lo cual es consistente con la sugerencia de que la ocupación del receptor GABA_a por periodos largos podría ser importante para la presencia de la tolerancia.

Las medidas tradicionales en el LEC como son el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en brazos abiertos se han empleado como un índice del efecto ansiolítico de las drogas. En otras palabras, dado que los espacios abiertos representan estímulos aversivos (Montgomery, 1955; Pellow et al., 1985) los sujetos evitan los brazos abiertos y por tanto pasan menos tiempo en estos. Pero la administración de ansiolíticos aumenta el número de cruces y de permanencia en los brazos abiertos (Cruz-Morales et al., 2002; File, Zharkovsky & Gulati, 1991; Lister, 1987; Weiss et al., 1998).

En este estudio se observó que la administración aguda de diazepam y midazolam aumentó el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos comparados con el grupo control. Este efecto fue mayor con midazolam, lo cual puede ser explicado en términos de potencia farmacológica de esta droga. Lo que coincide con reportes previos donde la administración de diazepam (Cooper, 1985; Weiss et al., 1998) y midazolam producen efectos ansiolíticos (Bertoglio & Carobrez, 2002b; Cruz-Morales et al., 2002).

Se ha reportado que la administración crónica de benzodiazepinas puede producir tolerancia y dependencia (Kalynchuk et al., 1994; Lazzarini, Malucelli, Muscará, Nucci & Palermo-Neto, 2003; Pérez et al., 2002; Pratt et al., 1998; Treit, 1985a) lo cual apoya los resultados de esta investigación, donde se demostró que con tratamientos crónicos de 3 semanas con dosis de 1 mg/kg, se desarrolló tolerancia al efecto ansiolítico del diazepam y midazolam. Por otro lado, se demostró que la tolerancia puede ponerse bajo control de estímulos contextuales de tipo configuracional, estos resultados son apoyados por reportes de otras investigaciones (Pérez et al., 2002; Poulos & Cappell, 1991; Siegel, 1975; Tirelli et al., 1992; Wolgin, 2000). De acuerdo con la teoría configuracional (Fantino, 2001; Pearce & Bouton, 2001; Pearce &

Wilson, 1991), los estímulos conforman un solo compuesto que en un modelo de condicionamiento informan o recuerdan al sujeto lo aprendido en ese contexto. De ahí su importancia como variable que altera el desarrollo de la tolerancia (Duncan et al., 2000; Siegel, 1975, Smith, 1990). Por lo que, si se presenta un estímulo compuesto en un condicionamiento o en una discriminación, se forma una representación configuracional de todo el patrón de estimulaciones (Contexto→El fase asociativa). Esta representación entra en una única asociación con el resultado de un ensayo. Se supone que la asociación se desarrolla gradualmente a lo largo de los ensayos y su fuerza determina la magnitud de la RC (en este caso la respuesta de tolerancia a los efectos ansiolíticos) que ocurre frente al patrón de estímulo presentada frente a la asociación.

De acuerdo a lo anterior, el modelo asociativo configuracional sustenta los presentes resultados, los cuales aportan y extienden la información que explica el fenómeno del desarrollo de la tolerancia dependiente del contexto.

Los resultados de estos experimentos demuestran que al probarse en un contexto diferente al de su historia farmacológica, la tolerancia no se presenta, dado que en esas condiciones se presenta un efecto ansiolítico. En otras palabras, la tolerancia se puede observar dependiendo ante qué contexto se prueben los sujetos, es mayor si la prueba se realiza en el mismo contexto de administración y es menor cuando la prueba se realiza en un contexto diferente al de su historia de condicionamiento (Larson & Siegel, 1998; Siegel, 1975).

Con base en los resultados de los Experimentos 3B, 5A y B, y 6A y B, las propiedades del contexto se adquieren no por una asociación directa con droga si no que, se adquieren a través de una relación entre el contexto y la droga, donde el contexto funciona como un facilitador que señala o indica la presentación de la droga (estímulo incondicionado). Lo cual está de acuerdo con estudios donde evalúan el contexto como estímulos múltiples presentados como una sola unidad de estímulos (Fantino, 2001; Pearce & Bouton, 2001; Rescorla & Wagner, 1972), apoyando la teoría de aprendizaje asociativo configuracional (Bucci et al., 2002; Fantino, 2001; Pickens & Holland, 2004; Wolgin, 2000).

Respecto a los resultados de los experimentos con flumazenil, los grupos tratados crónicamente con diazepam por 20 días y evaluado el día 21

en el mismo contexto con diazepam se observó el desarrollo de tolerancia, pero cuando a un grupo equivalente el día 21 se le administró flumazenil junto con diazepam no se presenta la tolerancia, sino ansiólisis dado que los sujetos mostraron un porcentaje mayor en entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos. Esto es, la administración de flumazenil previno la presentación de tolerancia en el grupo (D+F) de diazepam entrenado y evaluado en el mismo contexto, comparado con el grupo de diazepam probado y evaluado en diferente contexto (DB+F).

Resultados similares fueron obtenidos en los experimentos 5B de midazolam más flumazenil. Así, la administración de flumazenil más midazolam, tuvo efectos opuestos, en los grupos tratados crónicamente con midazolam se obtuvo un decremento en el porcentaje de entradas y de tiempo en los brazos abiertos comparado con los resultados de los grupos que recibieron administraciones crónicas de midazolam, lo que indica que el efecto ansiolítico del midazolam fue revertido por el flumazenil. Esto es apoyado por estudios donde el flumazenil revirtió los efectos de ansiedad producidos por la abstinencia al etanol en una prueba de interacción social (File et al., 1989), y el efecto ansiogénico de la abstinencia al clordiazepóxido en la prueba del LEC (Baldwin & File, 1989). Como se mencionó, el flumazenil, antagonista de las benzodiazepinas tiene propiedades agonistas parciales a dosis altas, esto podría en parte explicar la capacidad de la dosis baja utilizada en este experimento para prevenir la respuesta de tolerancia al efecto ansiolítico de las benzodiazepinas (Lister, et al., 1984).

Por último, se demostró que la tolerancia y el efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia al midazolam (Experimento 5B) puede ser revertido por el flumazenil, este efecto fue observado en los grupos M+F, MB+F respectivamente (Fig. 21 y 22) en las medidas del porcentaje de entradas y tiempo en los brazos abiertos. En el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos el efecto fue más pronunciado en ambos contextos cuando se administró flumazenil a los grupos de diazepam y midazolam.

Los resultados de esta investigación en general, están de acuerdo con los reportes que apoyan los procesos asociativos basados en condicionamiento clásico donde el contexto anuncia o predice la probabilidad de la presencia de la administración de la droga, en otras palabras se infiere que la manipulación

del medio externo (contexto) influye en la eficacia de la droga (Baker & Tiffany, 1985; Cepeda-Benito & Tiffany, 1996; Larson & Siegel, 1998; Siegel & Ramos, 2002). También se apoya la propuesta de Baker y Tiffany (1985) respecto a que la tolerancia asociativa se presenta con dosis bajas y altas e intervalos entre administración largos, mientras que la farmacológica se presentaría con ambas dosis e intervalos cortos, sin embargo los hallazgos de Cepeda-Benito ponen en duda esta teoría, dado que el reporta el desarrollo de tolerancia asociativa con dosis altas de morfina e intervalos de 96 horas y con dosis altas de morfina e intervalos de 6 horas se presenta tolerancia no asociativa (Cepeda-Benito & Tiffany, 1996).

Al mismo tiempo se apoyan los planteamientos de que es necesario un período de tratamiento largo para integrar la representación configuracional de las características individuales de los estímulos que conforman el contexto donde ocurren las administraciones de la droga (Cepeda-Benito & Tiffany, 1996; Fanselow, 1990). Estos planteamientos apoyan nuestros resultados en relación a que son necesarios tratamientos largos (administraciones de 21 días) para que se desarrolle la tolerancia y que el tipo de contexto sea una situación de una unidad de estímulos. Esto es reforzado por estudios que reportan que el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam se obtiene con tratamientos largos de 2-3 semanas ya que la tolerancia a estos efectos es lenta comparada con el desarrollo de tolerancia a los efectos de sedación de las benzodiazepinas donde con tratamientos cortos (3 a 7 días) se observa la tolerancia (Fernandes & File, 1999; File & Fernandes, 1994).

Otra forma de explicar los resultados, es por las diferencias farmacológicas. Sin embargo, como se mencionó, la naturaleza de los mecanismos para explicar los cambios en la tolerancia, aun no son claros, pero existen hallazgos que son consistentes (ver Wafford, 2005); por ejemplo parece haber una reducción en la potenciación de la respuesta Gabaérgica por la aplicación aguda de las benzodiazepinas después de la exposición crónica de alguna benzodiazepina, así los receptores parecen ser menos sensibles a un cambio agudo después de administraciones crónicas. Este efecto es intrínseco al mismo receptor, así como a la expresión de la recombinación de los subtipos (por ejemplo $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$).

Así mismo, el tratamiento crónico con benzodiazepinas, produce alteraciones en la expresión de los subtipos individuales de receptores, pero la evidencia es confusa, ya que se reporta hiperregulación de subunidades particulares para unos receptores, para otros no se observan cambios y otros reportan baja regulación en las subunidades, planteándose que estos cambios son específicos a regiones locales del cerebro (Wafford, 2005). Lo que podría estar relacionado con lo reportado de que hay un número de subtipos del receptor GABA_a, que se encuentran en diferentes partes en el SNC, los cuales pueden adaptarse a la presencia de las benzodiazepinas a diferentes tasas (ver revisión de Hutchinson, et al., 1996).

Lo anterior podría explicar los presentes resultados de los experimentos con tratamientos crónicos con las benzodiazepinas, esto es, que la composición de las subunidades de los receptores GABA_a sea responsable para ciertos efectos conductuales incluyendo la ocurrencia de la tolerancia como lo sugieren Hutchinson et al. (1996). También que la tolerancia a las benzodiazepinas se desarrolla debido a los cambios adaptativos en el sistema nervioso central, estos cambios adaptativos podrían ser atribuidos al sitio de unión de la benzodiazepina o al sitio de unión GABA al receptor GABA_a, por lo que el tipo de benzodiazepina podría ser relevante, con flurazepam y lorazepam se observa una baja regulación de los sitios de unión y el diazepam es inconsistente en la inducción de cambios (ver revisión de Hutchinson et al., 1996). Por lo que los mecanismos para explicar la tolerancia a las benzodiazepinas incluyen cambios en la unión del receptor a las benzodiazepinas, alteraciones en acoplamiento GABA-benzodiazepinas, incremento en el número de receptores, reducción de la sensibilidad de la neurona a la droga. En relación a las subunidades del GABA_a, los hallazgos sugieren que la administración crónica induce cambios en la expresión de las subunidades individuales. Pero estos resultados no son claros, ya que como se menciono se han descrito una baja regulación, hiperregulación o simplemente no hay efectos (Wafford, 2005).

En el caso de la tolerancia obtenida al diazepam como al midazolam que fue revertida por el flumazenil, podrían explicarse bajo los planteamientos de una baja regulación en la unión del receptor benzodiazepínico que se asocia con la tolerancia conductual a las benzodiazepinas (Fahey et al. 2001; Klein &

Harris, 1996). Y en el caso de los resultados de la reversión del efecto ansiolítico de ambas benzodiazepinas parece que están implicados cambios en la ocupación de los receptores que se modifican con una sola administración del flumazenil, el cual compite por la ocupación de los receptores benzodiazepínicos ya que el antagonista benzodiazepínico flumazenil muestra un perfil agonista a los receptores GABA_A que contienen algunas de estas subunidades, esto ha sido demostrado por Biggio et al. (2003). Lo que hace suponer que la administración aguda de flumazenil atenúa el efecto de este último, apoyando previos hallazgos de que el flumazenil atenúa el desarrollo de tolerancia al diazepam (Flaishon et al., 2003).

Con respecto a los efectos de la tolerancia cruzada de las benzodiazepinas al etanol. En el caso del diazepam se presentó el desarrollo de tolerancia cruzada al etanol dependiente del contexto, tanto en el porcentaje del número de entradas como en el de permanencia en los brazos abiertos. El grupo tratado con diazepam por 20 días y evaluado el día 21 en el mismo contexto con etanol (D+E) desarrolló tolerancia cruzada a esta droga, ya que los resultados fueron similares a los del grupo control. Y el grupo DB+E que el día 21 se le administró etanol en lugar de diazepam pero en un contexto diferente no presentó la tolerancia, sino el efecto de contexto sobre el efecto ansiolítico de la droga indicado en la conducta de los sujetos por un porcentaje mayor en entradas y tiempo permanencia en los brazos abiertos.

En la tolerancia cruzada del midazolam al etanol los resultados fueron similares a los del diazepam, siendo más pronunciado el efecto de contexto en el grupo MB+E, indicado por un mayor incremento en el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos. El que no se observaran diferencias entre el grupo de salina y el grupo crónico de midazolam evaluado con etanol (M+E) en el mismo contexto sugiere el desarrollo de tolerancia. Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos. Los resultados apoyan el hecho de que la tolerancia a un efecto particular de una droga (sedación, ansiólisis, etc.) también produce tolerancia cruzada a otras drogas que tengan el mismo efecto farmacológico que la primera droga administrada (Le et al., 1987; Poulos & Cappell, 1979). En estos experimentos tanto las dos benzodiazepinas como el etanol producen efectos similares como es el efecto ansiolítico. Y la tolerancia

cruzada entre estas drogas fue observada en una menor respuesta de las ratas a los efectos del etanol como consecuencia de tratamientos previos con el diazepam y midazolam. Y como ya se mencionó la tolerancia cruzada de estos resultados mostraron especificidad ambiental (contexto) cuando el etanol fue administrado en presencia de las señales que predecían la droga (diazepam y midazolam). En tales circunstancias, la tolerancia estuvo ausente en los sujetos con experiencia con la droga cuando el etanol fue administrado en la ausencia de las señales relevantes que integraban el contexto y predecían los efectos de la benzodiazepina, como lo plantea el modelo de Siegel.

Esta investigación se basó en el modelo de Siegel con el paradigma del Condicionamiento Pavloviano y fue demostrado que ratas expuestas a estímulos ambientales que conforman el contexto físico apareado con etanol desarrollaron tolerancia a los efectos ansiolíticos de ésta droga. Los resultados aportan datos empíricos de que la tolerancia se desarrolla a partir de la asociación de claves ambientales con el etanol con animales (Larson & Siegel, 1998; Le et al., 1987; Poulos & Cappell, 1991).

Se ha descrito que la tolerancia a los efectos ansiolíticos, anticonvulsivos y sedación se observa con dosis mayores de diazepam de 2, 5 y 10 mg/kg (Stephens & Schneider, 1985; Pratt et al., 1998; Pérez et al., 2002) y la dosis empleada en el presente experimento fue una dosis baja como las empleadas por Kalynchuk et al. (1994) y Treit (1985b).

Es importante señalar que la evidencia clínica ha mostrado que las benzodiazepinas son efectivas con tratamientos cortos, lo cual refleja el desarrollo de tolerancia. Y con animales se ha demostrado que la tasa a la que se desarrolla la tolerancia varía en función de sus efectos, dosis y tipo de droga.

Como se mencionó, el desarrollo de tolerancia al diazepam fue menos robusto comparado con el del midazolam, lo cual podría explicarse por la dosis baja de diazepam administrada (1 mg/kg). Se ha reportado que la tolerancia es mayor a los efectos anticonvulsivos del diazepam cuando se administran dosis crecientes en tratamientos crónicos (Kalynchuk et al., 1994), por lo que sería importante evaluar más estudios con dosis crecientes de diazepam en la tolerancia condicionada.

En cuanto a la medida de actividad motora, ésta es importante para obtener información acerca de la conducta de los animales, en general permite evaluar efectos conductuales de diferentes fármacos y de otras manipulaciones experimentales. El uso de agonistas de las benzodiazepinas genera efectos secundarios que se han relacionado con deterioro motor y ataxia (Enna & Bowery, 1997).

Se han descrito varias técnicas para medir la actividad motora desde el campo abierto, hasta la caja de actividad con fotoceldas (Ossenkopp, Macrae & Teskey, 1987) y el procedimiento del laberinto elevado en cruz emplea la actividad exploratoria como un reflejo de la actividad motora, la cual es interpretada como una medida de ansiedad (Pellow & File 1986). En los resultados donde se administró una dosis de 1 mg/kg de diazepam no se encontraron diferencias en la actividad motora, ni tampoco se obtuvieron diferencias cuando se evaluó la actividad motora en la cámara de fotoceldas. Estos resultados no concuerdan con los reportados por Pellow y File (1986) que sí reportan cambios en la actividad motora con dosis de 2 mg/kg, pero en este caso se usó 1 mg/kg.

Con respecto al flumazenil sólo se presentó efecto en la actividad motora vertical, esto es la actividad de alzadas es afectada por el flumazenil presentándose menor actividad comparado con el grupo control de salina y posteriormente el efecto del fármaco va disminuyendo conforme pasa el tiempo, es decir la actividad motora disminuye como resultado de habituación por el paso del tiempo.

En la actividad motora cuando se administró etanol no afectó tanto la actividad motora horizontal como vertical, estos datos concuerdan con resultados donde se ha reportado tolerancia cruzada al efecto de sedación del etanol de tipo farmacológico (Colombo et al., 1995) y alguno de tipo asociativo como el cambio en la temperatura (Le, et al., 1986); ansiedad (Wenger, et al., 1986) y efecto analgésico (Bell et al., 1998).

En el total de entradas a los brazos del LEC que muestran la actividad motora, en general no se observaron diferencias. Lo que indica que la actividad motora no fue alterada por el efecto de la droga correspondiente.

Los datos obtenidos en esta investigación con ratas, plantean la necesidad de introducir más elementos en aquellos tratamientos de adicciones

en humanos que están basados en el condicionamiento pavloviano. Y ponen de manifiesto la relevancia del análisis funcional de la conducta adictiva de la introducción de claves facilitadoras del evento que está asociado con la droga. Probablemente el problema de algunas terapias aversivas en el tratamiento del alcoholismo es que la recaída se presenta debido a que no se presta atención al evento asociado a la droga.

Es importante resaltar lo que la investigación básica sobre tolerancia y abstinencia a las drogas realizadas con animales, aporta a los profesionales que están inmersos en la problemática de las conductas adictivas. Tal como lo plantea Siegel y Ramos, "...los intereses del investigador de laboratorio frecuentemente parecen esotéricos para el clínico. Esta observación, probablemente no parecería inmediatamente relevante al investigador que estudia los procesos fundamentales de los efectos de los opiáceos en animales, éstas y otras observaciones clínicas y experimentales pretenden enfatizar la relación simbiótica entre el investigador y el clínico" (Siegel & Ramos, 2002. pp.162).

Estos resultados proveen información relevante para la comprensión de la conducta de adicción. Las respuestas condicionadas se desarrollan contrarrestando los efectos de la droga. Cuando los estímulos que son asociados a los efectos de la droga, presentes al momento de su consumo, tienen como resultado la disminución de los efectos de la droga, se observa entonces la tolerancia. De acuerdo a la investigación, las propiedades del contexto se adquieren no por una asociación directa con el EI sino que, se adquieren a través de una relación que controla la relación EC/EI, es decir, el contexto actúa como un facilitador o un inhibidor.

Los resultados de estos experimentos demostraron los siguientes hallazgos: a nivel conductual se demostró el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam y midazolam evaluados en el LEC; el fenómeno de tolerancia en general fue controlado por procesos de aprendizaje asociativo, apoyando el modelo de Siegel basado en el modelo de Pavlov en estudios del papel del contexto como un estímulo configuracional, en la investigación de la ansiedad provocada por nuevas situaciones en el modelo de ansiedad en animales.

En términos farmacológicos, los resultados de la tolerancia de nuestros experimentos se apoyan en los planteamientos respecto a los cambios en los subtipos del receptor GABA_a que se observan con administraciones crónicas y también reportan modificación en la expresión del gen que codifica las subunidades del receptor GABA_a (Follesa et al., 2000, 2001). Y estos cambios, podrían alterar la sensibilidad de los receptores del GABA_a a sus moduladores farmacológicos acentuando el desarrollo de tolerancia de éstas drogas.

Los resultados de los experimentos del flumazenil 5A y 5B, demostraron que la tolerancia fue revertida por la administración aguda del flumazenil, probablemente debido a que el flumazenil ocupa el lugar del receptor y previene la unión de ligandos, de acuerdo a la habilidad del GABA para mejorar o decrementar la unión del flumazenil en cuestión a receptores benzodiazepínicos como lo plantea (File & Pellow, 1986), y que también puede deberse al antagonismo de un ligando endógeno para receptores benzodiazepínicos (Lister, 1988). Lo que sugiere que el tratamiento crónico con benzodiazepinas podría incrementar los niveles de un ligando endógeno ansiogénico el cual es antagonizado por el flumazenil (File et al., 1989). Y en el caso de la tolerancia asociativa, el contexto puede provocar un efecto diferente en el estado del GABA cuando a los sujetos se le evalúa en un nuevo contexto produciendo otro cambio en el GABA. Lo que al parecer, el simple cambio de contexto es suficiente para reactivar a los receptores. Hay estudios donde se ha demostrado que la lesión de la corteza prefrontal en la inervación serotoninérgica en ratas sometidas al paradigma de miedo condicionado contextual produce cambios en la respuesta de congelamiento con solo probarlas en un nuevo contexto, y presentan cambios en las concentraciones de serotonina (Lehner et al., 2008); también cuando existen lesiones en el núcleo rafe medial se observa inactivación de las neuronas serotoninérgicas cuando se les presentan las señales contextuales asociadas con un choque eléctrico (Borelli, Gárgaro, dos Santos & Brandão, 2005).

Finalmente, estos resultados son relevantes para el campo de conocimiento, puesto que dan pauta para la investigación del papel del contexto evaluado con el modelo de ansiedad con drogas como las benzodiazepinas, ya que este campo ha sido poco investigado y se ha

planteado el efecto del aprendizaje, pero las investigaciones no son claras en cuanto a los efectos del aprendizaje asociativo, por lo que se requiere realizar mas investigación en este campo.

Conclusiones

1. Se demostró que el contexto tiene efectos sobre el desarrollo de la tolerancia a los efectos ansiolíticos del diazepam y midazolam. El desarrollo de la tolerancia fue más evidente, cuando los animales fueron evaluados en el mismo contexto donde tuvieron asociaciones contexto-droga.
2. Se obtuvieron resultados más importantes cuando el contexto fue manipulado como un espacio físico, que cuando se manipuló un estímulo discreto como el ruido.
3. La tolerancia asociativa fue antagonizada por el flumazenil, un antagonista del las benzodiazepinas, efecto que no ha sido reportado previamente. El simple cambio de contexto tuvo efectos sobre la respuesta del animal, para modificar su respuesta asociativa.
4. El desarrollo de la tolerancia cruzada benzodiazepinas etanol fue dependiente del contexto.
5. El modelo de condicionamiento es una explicación complementaria a la explicación farmacológica.
6. En este estudio las señales ambientales configuracionales fueron mejores predictoras de la presencia de la droga que las señales discretas.
7. El efecto del contexto sobre el desarrollo de la tolerancia fue más claro con el midazolam que con el diazepam. Lo que supone que tanto la vida media como la potencia de la droga fueron factores importantes para estos resultados.
8. El intervalo entre administraciones, la dosis, tipo de droga fueron factores relevantes para que no se obtuviera la tolerancia de tipo asociativo en algunos casos.

9. De acuerdo a los resultados, la tolerancia puede explicarse por mecanismos asociativos y no asociativos para la presencia o ausencia de la tolerancia.
10. Lo que implica que se debe considerar la relevancia de la variable contexto para la comprensión y explicación de los casos en humanos de la muerte por sobredosis.
11. Es importante considerar para futuros estudios de tolerancia asociativa a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas: el tipo y régimen de administración, la tarea empleada para evaluar los efectos ansiolíticos, el tipo de contexto.

Referencias

- Allison C. & Pratt A. J. (2003) Neuroadaptive processes in GABAergic and glutamatergic systems in benzodiazepine dependence. *Pharmacology and Therapeutics*. 98: 171-195.
- Baldwin H. A. & File S. E. (1989) Flumazenil prevents the development of chlordiazepoxide withdrawal in rats tested in the social interaction test of anxiety. *Psychopharmacology*. 97:424-426.
- Balsam P. D. (1985) The functions of context in learning and performance. Ed. Balsam P. D. & Tomie A. Context and Learning. (pp.1-24), Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Baker T. B. & Tiffany S. T. (1985) Morphine tolerance as habituation. *Psychology Review*. 92: 78-108.
- Bateson N. A. (2002) Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Current Pharmaceutical Design*. 8: 5-21.
- Beaufour C. C., Bihan C. L., Hamon M. & Thiébot (2001) Extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during reward-punishment and novelty-associated behavior. Effects of diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 69: 133-142.
- Beck A., Wright F, Newman C. & Liese B. (1999) *Terapia Cognitiva de las Drogodependencias*. España: Editorial Paidós Ibérica S.A.
- Bell R. L., Olson R. D. & Vaccarino L. A. (1998) Tolerant to ethanol analgesia is not accompanied by cross-tolerance to morphine analgesia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 59:123-127.
- Begg D. P., Hallman K. T. & Norman T. R. (2005) Attenuation of benzodiazepine withdrawal anxiety in the rat by serotonin antagonists. *Behavioural Brain Research*. 161: 286-290.
- Beninger R.J., Cooper T.A & Mazurski E.J. (1985) Automating the measurement of locomotor activity. *Neurobehavioral Toxicology Teratology*. 7:79-85
- Bertoglio L. J. & Carobrez A. P. (2002a) Anxiolytic effects of ethanol and phenobarbital are abolished in test-experienced rats submitted to the elevated plus maze. *Psychopharmacology Biochemistry and Behavior*. 73: 963-969.
- Bertoglio L. J. & Carobrez A. P. (2002b) Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 72: 449-455.

- Biggio G., Dazzi L., Biggio F., Mancuso L., Talani Giuseppe., Busonero F., Mostallino M. C., Sanna E. & Follesa P. (2003) Molecular mechanisms of tolerance to and withdrawal of GABA_A receptors. *Neuropsychopharmacology of Addiction*. 6: 41-423.
- Brailowsky S. (1995) Las sustancias de los sueños: *Neurofarmacología*. Cap. XVIII. Edit. SEP-Fondo de Cultura Económica, México.
- Borelli K. G., Gárgaro A. C., dos Santos J. M. & Brandão M. L. (2005) Effects of inactivation of serotonergic neurons of the median raphe nucleus on learning and performance of contextual fear conditioning. *Neuroscience Letters*. 387: 105-110.
- Brasser S. M. & Spear N. E. (2004) Contextual conditioning in infants, but not older animals, is facility by CS conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*. 81: 46-59.
- Bucci D. J., Sadoris M. P. & Burwel R. D. (2002) Contextual fear discrimination is impaired by damage to that postrhinal or perirhinal cortex. *Behavior Neuroscience*. 116: 479-478.
- Cappell H, Roach C, & Poulos C. X. (1981) Pavlovian control of cross-tolerance between pentobarbital and ethanol. *Psychopharmacology*. 74: 54-57.
- Carling R. W., Madin A., Guiblin A., Russell M. G. N., Moore K. W., Mitchinson A., Sohal B., Pike A., Cook S. M., Ragan I. C., McKernan R. M., Quirk K., Ferris P., Marshall G., Thompson S. A., Wafford K. A., Dawson G. R., Atack J. R., Harrison T., Castro J. L. & Street L. J. (2005) 7-(1,1-Dimethylethyl)-6-(2-ethyl-2H-1,2,4-triazol-3-ylmethoxy)-3-(2-fluorophenyl)-1,2,4-triazolo[4,3.b]pyridazine: A Functionally Selective γ -Aminobutyric Acid_A (GABA_A) α 2/ α 3-Subtype Selective. Agonist That Exhibits Potent Anxiolytic Activity but Is Not Sedating in Animal Models. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48:7089-7092.
- Cash D. J., Serfozo P. & Allan M. A. (1997) Desensitization of a γ -Aminobutyric acid type a receptor rat is increased by chronic treatment with chlordiazepoxide: a molecular mechanism of dependence. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 283: 04-71.
- Cedillo I. B. (2001) Tolerancia cruzada etanol-diazepam con condicionamiento clásico. *Tesis de Maestría en Farmacología Conductual*. FES Iztacala. UNAM: México.
- Celik E., Uzbay T. I. & Karakas S. (2006) Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. *Progress in Neuro. Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 30: 50-55.
- Cepeda-Benito A. & Tiffany S. T. (1995) Role of drugs-administration cues in the associative control of morphine tolerance in the rat. *Psychopharmacology*. 122: 312-316.

- Cepeda-Benito A. & Tiffany S. T. (1996) Test-specific manifestations of associative tolerance to the analgesic effects of morphine in the rat. *Psychobiology*. 24: 327-332.
- Cepeda-Benito A., Tiffany S. T. & Cox L. S. (1999) Context-specific morphine tolerance on the paw-pressure and tail-shock vocalization test: evidence of associative tolerance without conditioned compensatory responding. *Psychopharmacology*. 145: 426-432.
- Clement Y. & Chapoutier (1998) Biological basis anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 22: 623-633.
- Cole J. B., Hillman M., Seidelmann D., Klewer M. & Jones H. G. (1995) Effects of benzodiazepine receptor partial inverse agonists in the elevated plus maze test of anxiety in the rat. *Psychopharmacology*. 121: 118-126.
- Colombo G., Agabio R., Lobina C., Reali R., Fadda F. & Gessa G.L. (1995) Cross-Tolerance to ethanol and γ -hydroxybutyric acid. *European Journal of Pharmacology*. 273: 235-238.
- Cooper J. S. (1985) A microgram dose of diazepam produces specific inhibition of ambulation in the rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 22: 25-30.
- Cornfield-Summer P. K. & Stolerman Y. P. (1978) Behavioral tolerance. En D. E. Blackman and D. J. Sanger (Eds). *Contemporary Research in Behavioral Pharmacology*. (pp. 391-348), New York: Plenum Press.
- Crowell C. R., Hinson R. E., & Siegel S. (1981) The role of conditional drug responses in tolerance to the hypothermic effects of ethanol. *Psychopharmacology*. 73: 51-54.
- Cruz A. P. M., Frei F. & Graeff F. G. (1994) Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 49: 171-176.
- Cruz-Morales S. E. & Cedillo-Ildefonso B. (en prensa) Tolerance to the anxiolytic effects of benzodiazepines. En: Neural mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers. Milagros Méndez Ubach (Ed.) (pp.1-20) Research Signpost, Kerala, India.
- Cruz-Morales S. E., González-López, M. R. A., Gómez-Romero, J. G., Arriaga Ramírez J. C. P. (2003) Modelos de ansiedad. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*. 1 (29), 93-105.
- Cruz-Morales S. E., Santos N. R. & Brandão M. L. (2002) One-trial tolerance to midazolam as due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 72: 973-978.

- D Angelis D. L. (1995) Effects of valproate and lorazepam on experimental anxiety: Tolerance, withdrawal, and role of clonidine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 52: 329-333.
- Dazzi L., Serra M., Seu E., Cherchi G., Pisu M. G., Purdy R. H. & Biggio G. (2002) Progesterone enhances ethanol-induced modulation of mesocortical dopamine neurons : antagonism by finasteride. *Journal of Neurochemistry*. 87: 1103-1109.
- Duncan P. M., Alici T. & Woodward J. D. (2000) Conditioned compensatory response to ethanol as indicated by locomotor activity in rats. *Behavioral Pharmacology*. 11: 395-402.
- Ellinwood E. H., Nikaido A. M., Heeatherly D. G. & Bjornsson T. D. (1987) Benzodiazepine pharmacodynamics: evidence for biophase rate limiting mechanisms. *Psychopharmacology*. 91: 168-174.
- Enna S. J. & Bowery N.G. (1997) *The GABA receptors*. New Jersey: Humana press.
- Estes W. K. & Skinner B. F. (1941) Some quantitative properties of anxiety. *Journal of Experimental Psychology*. 29: 390-400.
- Fahey M. J., Pritchard A. G., Grassi M. J., Pratt S. J., Shader I. R. & Greenblatt J. D. (2001) Pharmacodynamic and receptor binding changes during chronic lorazepam administration. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 69: 1-8.
- Fantino E. (2001) Context: a central concept. *Behavioral Processes*. 54: 95-110.
- Fanselow M. S. (1990) Factors governing one-trial contextual conditioning. *Animal Learning Behavior*. 18: 264-270.
- Fernandes C., Andrews N. & File S. E. (1994) Diazepam withdrawal increases [³H]-5-HT release from rat amygdaloid slices. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 49, 2: 359 -362.
- Fernandes C., Arnot M. I., Irvine E. E., Bateson A. N., Martin I. L. & File S. E. (1999) The effect of treatment regimen on the development of tolerance to the sedative and anxiolytic of diazepam. *Psychopharmacology*. 145: 251-259.
- Fernandes C. & File S. E. (1999) Dizocilpine does not prevent the development of tolerance to the anxiolytic effects of diazepam in rats. *Brain Research*. 815: 431-434.
- Fernandes M., Kluwe S. & Cooper H. (1977) The development of tolerance to morphine in the rat. *Psychopharmacology*. 54: 197-201.
- File S. E. (1981) Rapid development of tolerance to the sedative effects of lorazepam and triazolam in rat. *Psychopharmacology. (Berlin)*. 73: 240-245

- File S. E. (1985b) Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neuroscience & Behavioral Reviews*. 9:113-121.
- File S. E. (1993) The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioral Brain Research*. 58: 199-202.
- File S. E. (1994) Chronic exposure to noise modifies the anxiogenic response, but not the hypoactivity, detected on withdrawal from chronic ethanol treatment. *Psychopharmacology*. 116: 369-372.
- File S. E., Baldwin A. H. & Hitchcott K. P. (1989) Flumazenil but not nitrendipine reverses the increased anxiety during ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology*. 98: 262-264.
- File S. E. & Fernandes C. (1994) Dizocilpine prevents the development of tolerant to the sedative effects of diazepam in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 47: 823-826.
- File S. E. & Pellow S. (1986) Intrinsic actions of the benzodiazepine receptor antagonist RO 15-1788. *Psychopharmacology*. 88: 1-11.
- File S. E., Zharkovsky A. & Gulati K. (1991) Effects of baclofen and nitrendipine on ethanol withdrawal responses in the rat. *Neuropharmacology*. 30: 2. 183-190.
- Flaishon R., Weinbroun A. A., Veeman L., Leschiner S., Rudick V. & Gavish M. (2003) Flumazenil attenuates development of tolerance to diazepam after chronic treatment of mice with either isoflurane or diazepam. *Anesthetic Analogue*. 97: 1046-1052.
- Follesa E., Serra E., Cagetti M. G., Pisu S., Floris F., Massa F., Sanna E. & Biggio G. (2000) Allopregnanolone synthesis *Biobehavioral Reviews* in cerebella granule cells: roles in regulation of GABA_A receptor expression and function during progesterone treatment and withdrawal. *Molecular Pharmacology*. 57: 1262-1270.
- Follesa E., Cagetti E., Mancuso F., Biggio F., Manca A., Maciocco E., Massa F., Desole S. M., Carta M., Busonero F., Sanna E. & Biggio G. (2001) Increase in expression of the GABA_A receptor $\alpha 4$ subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonist. *Molecular Brain Research*. 92: 138-148.
- Friedman L. K., Gibbs T. T. & Farb D. H. (1996) γ -Aminobutyric acid_A receptor regulation: heterologous uncoupling of modulatory site interactions induced by chronic steroid, barbiturate, benzodiazepine, or GABA treatment in culture. *Brain Research*. 707: 100-109
- Gallager D. W., Lakoski J. M., Gonsalves S. F. & Rauch S. L. (1984) Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity. *Nature* 308: 74-77.

- Gerlai R. (1998) Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: a strain comparison and a lesion study. *Behavioural Brain Research*. 95: 191-203.
- Goldstein A., Arnow L. & y Kalman S. M. (1974) Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology. Wiley, New York.
- Graeff G, F, Viana B. M. & Mora O. P., (1997) Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 21: 791-799.
- Griebel G., Perrault G., Simiand J., Cohen C., Granger P., Depoortere H., Francon D., Avenet P., Schoemaker H., Evanno Y., Sevrin M., George P. y Scatton B. (2003) SL651498, a GABA receptor agonist with subtype-selective efficacy, as a potential treatment for generalized anxiety disorder and muscle spasms. *CNS Drug Reviews*. 9: 3-20.
- Greeley J. & Cappell, H. (1985) Associative control of tolerance to the sedative and hypothermic effects of chlordiazepoxide. *Psychopharmacology*. 86: 487-493.
- Hajós-Korcsok E., Robinson D. D., Yu J. H., Fitch C. S., Walker E. & Merchant K. M. (2003) Rapid habituation of hippocampus serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated foot shock stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 74: 609-616.
- Hinson R. E., Poulos C. X., & Cappell H. (1982) A effects of pentobarbital and cocaine in rats expecting pentobarbital. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 16: 661-666.
- Hinson R. E., Poulos C. X. & Thomas W. L. (1982) Learning in tolerance to haloperidol induced catalepsy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 6: 395-398.
- Hinson R. E. & Siegel S. (1983) Anticipatory hyperexcitability and tolerance to the narcotizing effect of morphine in the rat. *Behavioral Neuroscience*. 97: 759-767.
- Hobbs W. R., Rall T. W. & Verdoom T. A. (1998) Hipnóticos y sedantes: Etanol. *Farmacología Terapéutica*. México, Editorial Manual Moderno.
- Holt R. A., Bateson A. N. & Martin I. L. (1996) Chronic treatment whit diazepam or abecarnil differentially affects the expression of GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat cortex. *Neuropharmacology*. 35: 1453-1463.
- Holt R. A., Martin I. L. & Bateson A. N. (1997) Chronic diazepam exposure decreases transcription of the rat GABA_A receptor γ_2 -subunit gene. *Molecular Brain Research*. 48: 164-166.
- Hutchinson M. A., Smith P. F. & Darligton C. L. (1996) The behavioral and neuronal effects of the administration of benzodiazepine anxiolytic and hypnotic drugs. *Progress in Neurobiology*. 49: 73-97.

- Ingum J., Bjorklund R., Volden R. & Morland J. (1994) Development of acute tolerance after oral doses of diazepam and flunitrazepam. *Psychopharmacology*. 113: 304-310
- Iversen L. (2004) GABA pharmacology-what prospects for the future? *Biochemical Pharmacology*. 68:1537-1540.
- Irvine E. E., Cheeta S., Lovelock C. & File E. S. (2001) Tolerance to midazolam's anxiolytic effects after short-term nicotine treatment. *Neuropharmacology*. 40: 710-716.
- Janhunen S. Linnervuo A., Svensk M. & Ahtee L. (2005) Effects of nicotine and epibatidine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 82: 758-765.
- Julien R. M. (1998) A primer of drug action. *A concise nontechnical guide to the actions, uses, and side effects of psychoactive drug*. (pp. 100-114). Nueva York: Freeman W. H.
- Kalant H., LeBlanc A. E. & Gibbens R. J. (1971) Tolerance to and dependence on some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacology Review*. 23: 135-191.
- Kalynchuk E. L., Kim K. C., Pinel J. P. & Kippin E. T. (1994) Effect of an ascending dose regimen on the development of tolerance to the anticonvulsant effect of diazepam. *Behavioral Neuroscience*. 108: 213-216.
- Kameyama T. & Nagasaka M. (1982) The effects of analgesics on quickly-learned conditioned suppression in mice. *Neuropharmacology*. 21: 1283-1289.
- Karavokiros t. K. A., Tsipis G. B., Suárez E. C. & Demers D. (1990) Flumazenil: A benzodiazepine antagonist. *DICP, Annals of Pharmacotherapy*. 24 (10): 976-981.
- Kasson B. J. (1992) Flumazenil: A specific benzodiazepine antagonist. *Journal of the American Association of Nurse Anesthetists*. 60 (5): 472 – 476.
- Klein R. L. & Harris A. (1996) regulation of GABA_A receptor structure and function by chronic drug treatments in vivo and with stably transfected cells. *Journal Pharmacology*. 70: 1-15.
- Kliethermes C. L. (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 28: 837-850.
- Kralic J.E., Buckley T. K., Khisti R. T. Hodge C. W., Homanics G. E. & Morrow A. L. (2002) GABA_A receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacology*. 43: 685-694.

- Krank M. D., Hinson R. E., & Siegel S. (1981) Conditional hyperalgesia is elicited by environmental signaled of morphine. *Behavior Neural Biology*. 32: 148-157.
- Lamprea M. R., Cardenas F. P., Vianna D. M., Castillo V. M., Cruz-Morales S. E. & Brandão M. L. (2002) The distribution of fos immunoreactivity in rat following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*. 950: 186-194.
- Larson S. & Siegel S. (1998) Learning and tolerance to the ataxic effect of ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61: 131-142.
- Leveleki Cs, Sziray N, Levay G, Barsvári B, Soproni K, Mikics E, Haller J. (2006) Pharmacological evaluation of the stress-induced social avoidance model of anxiety. *Brain Research Bulletin*. 69:153-60.
- Lazzarini R., Malucelli E. B., Muscará N. M., Nucci G. & Palermo-Neto J. (2003) Reduction of inflammation in rats by diazepam: tolerance development. *Life Sciences*. 72: 2361-2368.
- Le A. D., Khanna J. M. & Kalant H. (1987) Role of pavlovian conditioning in the development of tolerance and cross-tolerance to hypothermic effect of ethanol and hydralazine. *Psychopharmacology*. 92: 210-214.
- Le A. D., Khanna J. M., Kalant, H. & Grossi F. (1986) Tolerance to and cross-tolerance among ethanol, pentobarbital and chlordiazepoxide. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 24: 93-98.
- Le D. A., Mihic S. J. & Wu H. P. (1992) Animals models of drug addiction. *Neuromethods*. The Humana Press Inc. 24.
- Le D. A., Poulos C. X. & Cappell H. (1979) Conditional tolerance to the hypothermic effect of alcohol. *Science*. 206: 1109 -1110.
- LeBlanc A. E., Kalant H. & Gibbens R. J. (1975) Acute tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacology* (Berlin.) 41: 43-46.
- Lehner M., Taracha E., Turzynska D., Sobolewska A., Hamed A., Kolomanska P., Skórzewska A., Maciejak P., Zinder J., Bidzinski A., & Plaznik A. (2008) The role of the dorsomedial part of the prefrontal cortex serotoninergic innervation in rat responses to the aversively conditioned context: Behavioral, biochemical and immunocytochemical studies. *Behavioural Brain Research*. 192: 203-215.
- Lister R. G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92: 180-185.
- Lister R. G. (1988) Partial reversal of ethanol-induced reductions in exploration by two benzodiazepine antagonists (flumazenil and ZK 93426). *Brain Research Bulletin*. 21: 765-770.

- Lister R. G., Greenblatt D. J., Abernethy D. R. & File S. E. (1984) Pharmacokinetic studies on Ro 15-1788, a benzodiazepine receptor ligand, in the brain of the rat. *Brain Research*. 290: 183-186.
- Lister R. G. & Hilakavi L.A. (1988) The effect of novelty isolation, light and ethanol on the social behavior of mice. *Psychopharmacology*. 96: 181-187.
- Little H. J., Taylor S. C., Nutt D. J. & Cowen P. J. (1985) The benzodiazepine antagonist, RO 15-1788 does not decrease ethanol withdrawal convulsions in rats. *European Journal Pharmacology*. 107: 375-377.
- Mackintosh N. J. (1975) *The Psychology of Animal Learning*. London: Academic Press.
- Malizia A. L. & Nutt D. J. (1995) The effects of flumazenil in neuropsychiatric disorders. *Clinical Neuropharmacology* 18: 215-232
- Mansfield J. G & Cunningham C. L. (1980) Conditioning and extinction of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in rats. *Journal Comparative Physiology Psychology*. 94: 962-969.
- Marin H. R., Pérez F. M., Duero G. D. & Ramirez A.O. (1999) Preexposure to drug administration context blocks the development of tolerance to sedative effects of diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 64. 3: 473-477.
- Mckim A. W. (1986) Drug state conditioning, tolerance, dependence, and self-administration. *Drugs and Behavior. An Introduction to Behavioral Pharmacology*. Nueva Jersey: Prentice-Hall.
- McNamara R. K. & Shelton R. W. (1997) Tolerance develops to the spatial learning deficit produced by diazepam in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 56: 383-389.
- Melchior C. L. (1988) Environment-dependent tolerance to ethanol produced by intracerebroventricular injections in mice. *Psychopharmacology (Berlin)*. 96: 258-261.
- Melchior C. L. & Tobakoff B. (1985) Features of environment-dependent tolerance to ethanol. *Psychopharmacology*. 87: 94-100.
- Miller L. G., Galpern W. R., Greenblatt D. J., Lumpkin M. & Shader R. I. (1990) Chronic benzodiazepine administration. VI. A partial agonist produces behavioral effects without tolerance or receptor alterations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 254: 33-38.
- Möhler, H., Benke, D., Benson, J., Lüscher, B., Rudolph, U. & Fritschy, J. M. (1997) Diversity in structure, pharmacology, and regulation of GABA_A receptors. En: Enna, S. J. y Bowery, N. G. (Eds). *The GABA Receptors*, (pp. 11-36) 2° Ed. New Jersey: Humana Press.

- Montesinos J. V. & López-Corral J. C. (1990) *Drogodependencias aspectos farmacológicos y clínicos*. Universidad Complutense de Madrid.
- Montgomery K. C. (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal Comparative Physiology Psychology*. 48: 254-260.
- Mototaka N. K. & Nobutaka D. (2003) The influence of contextual cue on antinociceptive tolerance and facilitation of memory with morphine. *Journal Pharmacology Science*. 92: 237-244.
- Nutt D. J. y Costello M. J. (1988) Rapid induction of lorazepam dependence and reversal with flumazenil. *Life Science*. 43: 1045-1054.
- Nutt D. J. y Malizia A. L. (2001) New insights into the role of the GABA_A benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *The British Journal of Psychiatry*. 179: 390-396.
- O' Brien, C. P. (1996). Adicción y Abuso de Sustancias. En Goodman, L. & Gilman, G. L. (Eds.). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (pp. 598-599): México: MacGraw-Hill.
- Ossenkopp K. P, Macrae L. K. y Teskey G. C. (1987) Automated multivariate measurement of spontaneous motor activity in mice: Time course and reliabilities of the behavioral measures. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 27: 565-568.
- Paletta M. S. & Wagner A. R. (1986) Development of context-specific tolerance to morphine: Support for a dual-process interpretation. *Behavior Neuroscience*. 100: 611-623.
- Pavlov I. P. (1927) *Conditioned reflex*. Londres: Oxford University Press.
- Pearce J. M. & Bouton M. E. (2001) Theories of associative learning in animals. En Fiske S.T., Schacter D. L., Zahn-Waxler C. (Eds), *Annual Review of Psychology*. 52: 111-139.
- Pearce J. M. & Wilson P. N. (1991) Effects of extinction with a compound conditioned stimulus. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 17, 151-162.
- Pellow S. & File E. S. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test on anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 24: 525-529.
- Pellow S., Chopin P., File S. E. & Briley M. (1985) Validation of open: closed arm entries in to an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal Neuroscience Methods*. 14: 149-167.

- Pérez M. F., Maglio L. E., Marchesini G. R., Molina J. C. & Ramirez O. A. (2002) Environmental changes modify the expression of diazepam withdrawal. *Behavioral Brain Research*. 136: 75-81.
- Pesold C., Caruncho H. J., Inpagnatiello F., Berg M. J., Fritschy J. M., Guidotti A. & Costa E. (1997) Tolerance to diazepam and changes in GABA_A receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neuroscience*. 79: 477-487.
- Pickens I. C. & Holland P. C. (2004) Conditioning and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 28: 651-661.
- Poulos, C. X. & Cappell, H. (1979) An associative analysis of pretreatment effects in gustatory conditioning by amphetamine. *Psychopharmacology*. 64: 201-207.
- Poulos, C. X. & Cappell, H. (1991) Logical adaptation. Homeostatic theory of drug tolerance: A general model of physiology. *Psychological Review*. 98: 390-408.
- Poulos C. X. & Hinson R. (1984) A homeostatic model of pavlovian conditioning: Tolerance to scopolamine-induced adipsy. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 10: 75-89.
- Poulos C. X., Hunt T. & Cappell H. (1988) Tolerant to morphine analgesia is reduced by the novel addition of omission of an alcohol cue. *Psychopharmacology (Berlin)*. 94: 412-416.
- Poulos C. X., Wilkinson D. A. & Cappel H. (1981) Homeostatic regulation and pavlovian conditioning in tolerance to amphetamine induced anorexia. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 95, 735-746.
- Pratt A. J., Brett R. R. & Laurie J. D. (1998). Benzodiazepine dependence: From neural circuits to gene expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 59: 925-934.
- Ramsey-Williams A. V., Wu Y. & Rosenberg C. H. (1994) Comparison of anticonvulsant tolerance, cross tolerance, and benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with diazepam or midazolam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 48: 765-772.
- Rescorla, R. A. (1967) Pavlovian conditioning and its proper control procedures. *Psychological Review*. 74: 71-80.
- Rescorla, R. A., & Wagner, A. R. (1972). A theory of pavlovian conditioning variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. En A. H. Black, & Prokasy (Eds.), *Classical Conditioning. Current Research and Theory*. (pp 64-69). Nueva York: Appleton-Century-Crofts.
- Rodgers R. J. & Cole J. C. (1994) The elevated plus- maze: Pharmacology, Methodology and Ethologic. En: Cooper S. J. and Hendrie, C. A. (Eds.). *Ethology and Psychopharmacology*. (pp 9-44), John Wiley and Sons.

- Rodgers R. J. & Johnson J. T. (1995) Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 52 (2): 297-303.
- Rodgers R. J. & Shepherd J. K. (1993) Influence of prior maze experience on behavior and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*. 113: 237-242.
- Rosenberg, H. C. (1995) Differential expression of benzodiazepine anticonvulsant cross-tolerance according to time following flurazepam or diazepam treatment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 51: 363-374.
- Sanders S. K. & Shekhar A. (1995) Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdale. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 52: 701-706.
- Sanger D. J., Benavides J., Perrault G., Morel E., Cohen C., Joly D. & Zivkovic B., (1994) Recent developments in the behavioral pharmacology of benzodiazepine (w) receptors: evidence for the functional significance of receptor subtypes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 18: 355-372.
- Sanger D. J., Jol D. & Perrault G. (1995) Benzodiazepine (w) receptor partial agonists and the acquisition of conditioned fear in mice. *Psychopharmacology*. 121: 104-108.
- Schmitt U. & Hiemke C. (1998) Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 59: 807-811.
- Schmitt U., Luddens H. & Hiemke C. (2001) Behavioral analysis indicates benzodiazepine-tolerance mediated by the benzodiazepine binding-site at the GABA_A-receptor. *Progress. Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 25: 1145-1160.
- Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F.A., Rodriguez M., Rhee L. M., Ramachandran J., Reale V., Glencorce T. A., Seeburg P. H. & Barnard E. A. (1987) Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super family. *Nature*. 328: 221-227.
- Siegel S. (1975) Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *Journal Comparative and Physiological Psychology*. 89: 498-506.
- Siegel S. (1976) Morphine analgesic tolerance: Its situation specificity supports a Pavlovian conditioning model. *Science*. 193: 323-325.
- Siegel S. (1977) Morphine tolerance acquisition as an associative process. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. 3: 1-13.
- Siegel S. (1978) Tolerance to the hypothermic effect of morphine in the rat is a learned response. *Comparative Physiology Psychology*. 92: 1137-1149.

- Siegel S. (1983) Classical conditioning, drug tolerance, and drug dependence. En Israel Y., Glaser F. B., Kalant H., Popham R. E., Schmidt W. & Smart R. G. (Eds.). *Research Advances in Alcohol and Drug problems*. 7 (pp. 207-246). Nueva York: Plenum Press.
- Siegel S. (1987) Pavlovian conditioning and ethanol tolerance. *Alcoholism Supplement*. 1: 25-36.
- Siegel, S. (1989). Pharmacological conditioning and drug effects. En M. W. Emmett-Oglesby, & A. J. Goudie (Eds.). *Tolerance and Sensitization. to Psychoactive Drugs*, Clifton, NJ: Human Press
- Siegel S., Baptista M.A., Kim J.A., McDonald R.V. & Weise-Kelly L. (2000) Pavlovian psychopharmacology: The associative basis of tolerance. *Experimental Clinical Psychopharmacology*. 8: 276-293.
- Siegel S. & Ramos, B. M. (2002) Applying laboratory research. Drug anticipation and the treatment of Drug Addiction. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*. 10: 162-183.
- Seeley R. J., Hawkins M. H., Ramsay D. S., Wilkinson C. W. & Woods S. C. (1996) Learned tolerance to the corticosterone-increasing action of ethanol in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 55: 268-273.
- Skinner B.F. (1938). *The behavior of organisms. An experimental analysis*. New York: Appleton
- Smith J. (1990) Situational Specificity of tolerance to decreased operant responding by cocaine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 36: 473-477.
- Smith M. D. & Cedric M. (1993) *Farmacología*. Argentina: Panamericana.
- Stephens N. D. & Schneider H. H. (1985) Tolerance to the benzodiazepine diazepam in an animal model of anxiolytic activity. *Psychopharmacology*. 87: 322-327.
- Storer J. R., Akerman S., Shields G. K. & Goadsby J. P. (2004) GABA-a receptor modulation of trigeminovascular nociceptive neurotransmission by midazolam is antagonized by flumazenil. *Brain Research*. 1013: 188-193.
- Strohle A., Kellner M. & Holsboer (1999) Behavioral, neuroendocrine and cardiovascular response to flumazenil: no evidence for altered benzodiazepine sensitivity in panic disorder. *Biological Psychiatry*. 45: 321-326.
- Subkov A. A. & Zilov G. N. (1973) The role of conditioned reflex adaptation in the origin of hyperergic reactions. *Bulletin Biology Medicine Experimental*. 4: 294-296.
- Suzuki M., Uchiumi M. & Murasaki M. (1995) A comparative study of the psychological effects of DN-2327, a partial benzodiazepine agonist, and alprazolam. *Psychopharmacology*: 121: 442-450.

- Szyndler J., Sienkiewics-Jarosz H., Maciejak P., Siemiatkowski M., Rokicki D., Czlonkowska I. A. & Plaznik A. (2001) The anxiolytic-like effect of nicotine undergoes rapid tolerance in a model of contextual fear conditioning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 69: 511-518.
- Thompson, T. T., & Boren, J. J. (1983). Farmacología conductual operante. En W. K Honing y J. E. R. Staddon (Eds.), *Manual de conducta operante* (pp. 110-119). México: Trillas.
- Tiffany S. T., Drobos D. J. & Cepeda-Benito A. (1992) Contribution of associative and no associative processes to the development of morphine tolerance. *Psychopharmacology*. 109: 185-190.
- Tirrelli E., Jodogne C. & Legros J. J. (1992) Oxytocin blocks the environmentally conditioned compensatory response present after tolerance to ethanol-induced hypothermia in mice. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 43: 1263-1267.
- Treit D. (1985a) Evidence that tolerance develops to the anxiolytic effects of diazepam in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 22: 383-387.
- Treit D. (1985b) The inhibitory effect of diazepam on defensive burying: anxiolytic vs. analgesic effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 22: 47-52.
- Treit D. (1985c) Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 9:203-22.
- Treit D., Pesold C. & Rotzinger S. (1993) Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacological validated models of rat anxiety. *Behavioral Neuroscience*. 107: 770-785.
- Trujillo A. K., Kubota S. K. & Warmoth P. K. (2004). Continuous administration of opioids locomotor sensitization. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 79: 661-669.
- Vellucci S. V. & File S. E. (1979) Chlordiazepoxide loses its anxiolytic action with long-term treatment. *Psychopharmacology*. 62: 61-65.
- Vigorito M., Lau E. C., Tang M. & Falk L. J. (1991) M withdrawal and discriminative motor control: effects of FG 7142 and Ro 15-1788. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 39: 351-359.
- Vila C. J. & Cedillo I. B. (1991) Tolerancia cruzada etanol-pentobarbital mediada por factores asociativos. *XI Coloquio de Investigación*. ENEP Iztacala.
- Wafford A. K. (2005) GABAA receptor subtypes: any cues to the mechanism of a benzodiazepine dependence? *Current Opinion of Pharmacology*. 5: 47-52.

- Wagner A. R. (1981) SOP: A model of automatic memory processing in animal behavior. En Spear N. E. y Miller R. R. (Ed) *Information processing in animal: memory mechanisms*. (pp. 5-47) New Jersey: Erlbaum Hillsdale.
- Weiss S. M., Wadsworth G., Fletcher A. & Dourish C. T. (1998) Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 23: 265-271.
- Wenger R. J., McEvoy M. P. & Woods C. S. (1986) Sodium pentobarbital-induced cross-tolerance to ethanol is learned in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 25: 35-40.
- White M. A., Roberts C. D. & Best J. P. (2002) Context-specific tolerance to the ataxic effects of alcohol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 72: 107-110.
- Wolgin D. L. (2000) Contingent tolerance to amphetamine hypophagia: new insights into the role of environmental context in the expression of stereotypy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 24 (3): 279-294.
- Woods J. H., Katz J. L. & Winger G. (1992) Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacology Review*. 44: 151-347.
- Zangrossi H. Viana M. B. & Graeff F. G. (1999) Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the elevated T-maze. *European Journal Pharmacology*. 369: 267-270.
- Zarrindast R. M., Faraji N., Rostami P., Sahataei H. & Ghoushouni H. (2003) Cross-tolerance between morphine and nicotina-induced conditioned place preference in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 74: 363-369.