



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA
HIPEREXCITABILIDAD NEURONAL QUE
CARACTERIZA AL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A
DIAZEPAM SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL Y DE
ANSIEDAD DE LA RATA”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

JOSÉ MARÍA CORNEJO MONTES DE OCA

DIRECTOR:

DR. EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

REVISORES:

DRA. ALEJANDRA RUIZ CONTRERAS

DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA

DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO

MTRA. CÁNDIDA MARÍA CRISTINA LEMINI GUZMÁN

MÉXICO D.F. 2011





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.



**El presente trabajo de Tesis
fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología de la
División de Investigaciones en Neurociencias del
Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”**

MUCHAS GRACIAS

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





**El presente trabajo de Tesis también
fue Apoyado por la Comisión Coordinadora
de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales
de Alta Especialidad. Beca PROBEI**

MUCHAS GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está especialmente dedicada a mi familia:

Lucia Montes de Oca Martínez
Anahel Cornejo Montes de Oca
Y
Josué Cornejo Montes de Oca

Gracias por seguir confirmando lo sencilla que es la vida y el amor incondicional que siempre me han dado.

A mi tutor Eduardo Calixto por todas las enseñanzas que compartió conmigo dentro del laboratorio y por el apoyo académico que me brinda. A mi amigo Jaime que compartió tantos momentos de una gran amistad.

A Ana Karen por haber cambiado mi experiencia en la UNAM y por compartir este momento tan especial para mí. A hermanos Isaac, Eugenia, Ever, Rosendo, Paty, Mariana, Karina, Karla y todas las demás personas que he conocido por acercarme al mundo de la investigación, por su amistad y todas sus aportaciones para que este trabajo y mi estancia en el laboratorio fuera una de las mejores experiencias en mi vida. Así como a Mario, Álvaro y su familia, Pachin, Monse, Jazz, toda la banda de la facultad de Psicología y a Lidia por tantos años de amistad.

Y por último un agradecimiento muy especial y con todo mi cariño a Teresa Maldonado y a toda su familia por que sin su apoyo esto no sería real.

Todos y cada uno de Uds. han aportado un poco en mi Ser. Gracias a todos

*“And when the night is cloudy,
There is still a light that shines on me
Shine until tomorrow, LET IT BE”*

	Página.
ÍNDICE	
Resumen	7
Lista de abreviaturas	9
II Introducción	10
1.- Sistema inhibitor GABAérgico	11
1.1.-El ácido-γ-amino butírico (GABA), síntesis y metabolismo	11
1.2.-Recaptura del GABA	14
1.3.-Fisiología del sistema GABAérgico	15
1.4.-El receptor GABA _B	17
1.5.-El receptor GABA _A	18
1.6.-Modulación del GABA _A	20
1.7.-Distribución del GABA _A en el Sistema Nervioso Central (SNC)	21
2.-Síndromes de Abstinencia asociados con la neurotransmisión GABAérgica	24
2.1.- Tolerancia y dependencia	25
2.2.- Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia	27
3.-Conducta Sexual	29
3.1.-Etapas de la Cópula de la rata.	29
3.2.-Patrones conductuales copulatorios	30
3.3.-Hormonas esteroides sexuales	32
3.4.-Neuroesteroides	33
3.5.-Regulación de receptores GABA _A a través de neuroesteroides	36
4.-Benzodiacepinas (Bzs) y Farmacología del Diazepam (Dz)	36
4.1.-Abstinencia a Bzs	36
4.2.-Farmacología del Dz	38
4.3.-Farmacodinamia y farmacocinética del Dz	39
4.4.-El síndrome de abstinencia a Dz	40
4.5.-Modificaciones Electroencefalográficas (EEG) y moleculares en la Abstinencia a Dz	41
II Justificación	43
III Objetivo	44

IV	Hipótesis	46
V	Material y Método	47
	V.I Cirugía Ovariectomía (Ov)	52
	V.II Hormona- <i>priming</i>	53
	V.III Prueba de conducta sexual en la rata hembra	53
	V.IV Prueba de conducta sexual en la rata macho	54
	V.V Prueba del Laberinto Elevado en Cruz (LEC) para determinar ansiedad	54
	V.VI Estudio de los cambios en la excitabilidad neuronal de la abstinencia por el Síndrome de Abstinencia a Diazepam (SAD): valoración en la inducción de crisis convulsivas por Pentilenetetrazol	56
	V.VII Realización de la Cirugía Estereotáxica	57
	V.VIII Logística de la obtención del EEG	58
VI	Resultados	61
	VI.I Efecto de la Abstinencia a Dz en la Conducta Sexual de la Rata Hembra	61
	VI.II Efecto de la Abstinencia a Dz en la Conducta Sexual de la Rata Macho	63
	VI.III Perfil Ansiogénico en el Segundo Día de Abstinencia a Dz de la Rata Hembra	64
	VI.IV Porcentaje de Tiempo de Permanencia a los Brazos del LEC de las Ratas Hembras	67
	VI.V Diferencia del Número de Entradas en los Brazos del LEC entre Machos y Hembras	69
	VI.VI Diferencia del Porcentaje de Tiempo de Permanencia en los Brazos del LEC entre Machos y Hembras	70
	VI.VII Incremento en la Susceptibilidad a Inducir Crisis Convulsivas en la Rata Hembra Durante el SAD	72
	VI.VIII Diferencia en la Susceptibilidad a Inducir Crisis Convulsivas en Ratas Hembras y Ratas Machos Durante el SAD.	74
	VI.IX Registro de la Actividad EEG antes y después del SAD en Ratas Machos y Hembras Ovariectomizadas (Ovx)	76
VII	Discusión	84
	VII.I Cambios en la Conducta Sexual por el SAD, Efectos Diferenciales en Rata Macho y Rata Hembra	86
	VII.II Cambios en la Ansiedad Generados por el SAD	91

VII.III	Diferencias Sexuales en la Susceptibilidad a Presentar Crisis Convulsivas Durante el SAD	94
VII.IV	Cambios en el EEG de las Ratas Hembra Ovx y Macho Antes, Durante y Después del Tratamiento con Dz	96
VIII	Conclusiones	100
IX	Referencias	101

RESUMEN

Los cerebros de macho y hembra muestran diferencias morfológicas y fisiológicas: el cerebro de hembra tiene mayor contacto sináptico, conexión interhemisférica y modulación hormonal cíclica, que el de machos. Las hormonas sexuales modulan la excitabilidad neuronal, asimismo el ácido- γ -amino butírico (GABA) participa en la modulación de la conducta sexual: favoreciendo el apareamiento y la receptividad. La interrupción abrupta de la administración crónica de algún agonista GABAérgico (benzodiazepinas, alcohol o neuroesteroides) genera síndromes de abstinencia, caracterizados por un incremento de la actividad neuronal. Sin embargo, desconocemos si las manifestaciones clínicas de la abstinencia a fármacos GABAérgicos son iguales entre ratas machos y hembras. La hipótesis del presente estudio plantea que las diferencias sobre la hiperexcitabilidad neuronal, la conducta sexual y la ansiedad que caracterizan a una abstinencia por una modificación del receptor GABA_A dependen del sexo del cerebro.

Los objetivos de la presente tesis fueron identificar durante el Síndrome de Abstinencia a Diazepam (SAD): 1) si existen diferencias en la conducta sexual y de ansiedad 2) Identificar las diferencias electroencefalográficas (EEG) y la susceptibilidad a desarrollar crisis convulsivas entre ratas hembras y machos.

Utilizamos ratas hembras ovariectomizadas (Ovx; N=52) y machos intactos (N=24) de la cepa Wistar (250-350 g), formando 5 grupos: 1) Inducción del SAD: administración de Diazepam (7mg/Kg; 10 días, i.p.) 2) Inducción de la conducta sexual: las ratas Ovx recibieron 17 β -Estradiol (10 μ g; s.c.) 48h previas a la prueba asociado a progesterona (30 μ g; s.c.; 4h previas a la valoración de la conducta). Evaluamos el número y cociente de lordosis; para los machos se evaluó el número de montas e intromisiones. 3) Para medir la ansiedad se utilizó la prueba del Laberinto Elevado en Cruz. 4) Para identificar el tiempo de la primera crisis epiléptica se administró pentilenetetrazol (60mg/Kg). 5) Al estudiar los cambios en el EEG, realizamos un registro de la actividad cortical. Se utilizaron las pruebas estadísticas *t de student* y *U de Mann Whitney*.

Los resultados durante el SAD fueron: 1) La conducta sexual se incrementó únicamente en ratas hembras (20%; $p \leq 0.04$). 2) La ansiedad es semejante en ambos sexos. 3) Las ratas macho son más vulnerables (20%; $p \leq 0.05$) a desarrollar crisis convulsivas. 4) El EEG evidenció actividad epileptiforme la cual fue mayor para los machos (2900%; $p \leq 0.04$) en los primeros estadios; así como mayor actividad en el lóbulo parietal de las frecuencias entre 0-25Hz ($p \leq 0.001$).

El incremento de la excitabilidad neuronal por cambios en la actividad GABAérgica es mayor en el cerebro de las ratas macho, identificando con ello que la modulación de los estrógenos (E) y la progesterona (P) reducen la vulnerabilidad de modificaciones neuronales en las hembras.

Lista de abreviaturas

Alop	Alopregnanolona, tetrahidroprogesterona, 3 α -hidroxi-dihidroprogesterona.
AMPA	Ácido metil-3-hidroxi 5-metil 4-oxazole propiónico
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BA	Brazos abiertos
BC	Brazos cerrados
Bic	Bicuculina
Bz (s)	Benzodiazepina (s)
CA1	Área CA1 del hipocampo
Ca ²⁺	Ión calcio
CB1	Receptores para cannabinoides tipo 1
Cl ⁻	Ión cloro
Dz	Diazepam
E	17- β estradiol
EEG	Electroencefalograma, electroencefalográfico
fEPSP	Potencial postsináptico excitatorio de campo (por sus siglas en inglés)
GABA	Ácido (γ) gamma amino butírico (4-aminobutirato)
GABA _A	Receptor ionotrópico de GABA (receptor tipo A)
GABA _B	Receptor metabotrópico de GABA (receptor tipo B)
GABA-T	Enzima GABA-transaminasa
GAD	Enzima glutamato descaboxilasa o L-glutamato 1-carboxilasa-liasa
GHB	Ácido γ -hidroxi-butírico
GLU	Glutamato o ácido glutámico
GLN	Glutamina
h	Hora
IPSP	Potencial post-sináptico inhibitorio
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente"
K ⁺	Potasio
LEC	Laberinto elevado en cruz
min	Minuto
Na ⁺	Sodio
NMDA	N-metil D-aspartato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Fosfato de piridoxal
PTZ	Pentilenetetrazol
SAG	Síndrome de abstinencia a GABA
SAD	Síndrome de abstinencia a diazepam
SNC	Sistema Nervioso Central
TACA	Ácido trans-4 aminocrotónico
TM	Dominio transmembranal

I. Introducción

La administración crónica de fármacos que incrementan la actividad GABAérgica, como las Benzodiazepinas (Bzs), los barbitúricos o el alcohol, generan estados de tolerancia y dependencia (O'Brien, 1996). El retiro abrupto de la administración de estas fármacos favorece a largo plazo la aparición de excitación neurológica caracterizada por cambios en la actividad sensorial-perceptiva, alucinaciones y en casos extremos, crisis convulsivas (Smith, 1996, Souza et al, 2008).

La privación súbita de Diazepam (Dz) después de un tratamiento crónico genera cambios en el electroencefalográfico (EEG) caracterizados por disminución de las ondas de baja frecuencia durante el sueño, a nivel conductual genera ansiedad y a nivel molecular hay una sobre expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A asociada a una reducción de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, además de una regulación a la alta de la densidad del receptor AMPA y regulación a la baja del receptor NMDA (Norbe et al, 2007).

Por otro lado, las interacciones de las Bzs y las diferencias sexuales en el cerebro, así como los diferentes niveles de esteroides sexuales (testosterona, estrógenos y progesterona), modulan los efectos del Dz y el EEG en machos y hembras (Romano et al, 2002). Así mismo, los efectos ansiolíticos de las Bzs son sexualmente dismórficas y pueden depender de la producción hormonal en distintas fases del ciclo estral (Férrandez-Guati et al, 2003).

Con el fin de distinguir los cambios en la actividad neuronal desarrollados por el retiro de Dz y las diferencias sexuales que pueden existir, en este proyecto de tesis se estudiaron las modificaciones de la excitabilidad *in vivo* a través de pruebas conductuales y un estudio electroencefalográfico.

A continuación se enmarcan los aspectos básicos de la neurotransmisión GABAérgica, sus receptores, su fisiología y su importancia en el cerebro.

1. Sistema inhibitor GABAérgico

1.1 El ácido- γ -amino butírico (GABA), síntesis y metabolismo

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

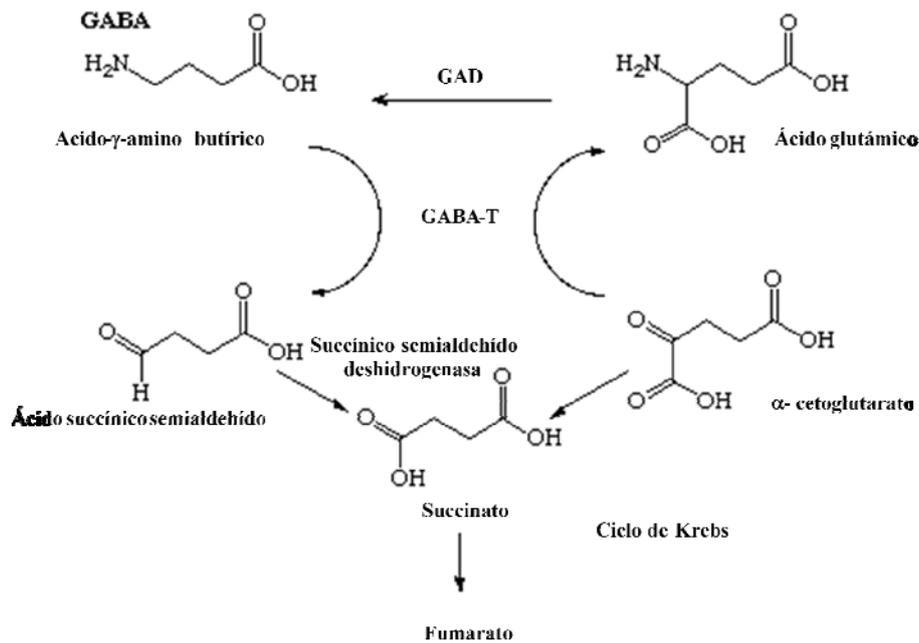
El neurotransmisor GABA fue descubierto en 1950 por Eugene Roberts (Krnjevic', 1991) y fue hasta 1957 cuando se publicó la primera evidencia que sugería que el GABA era un neurotransmisor. Bazemore y colaboradores (1956) identificaron una sustancia endógena o "factor I" como responsable de la acción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

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

El GABA se produce en las terminales nerviosas por descarboxilación del glutamato, por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) también conocida como L-glutamato-1-carboxilasa-liasa. La mayor parte del ácido glutámico necesario para la formación del GABA no proviene del torrente sanguíneo, la neurona posee un mecanismo enzimático de síntesis que utiliza a la α -cetoglutarato por una transaminación oxidativa mediante la GABA transaminasa (GABA-T), o por un proceso de desaminación de la glutamina a través de la enzima glutaminasa; por lo que de acuerdo a estos eventos metabólicos las fuentes del ácido glutámico son: 1) la transformación del α -cetoglutarato, metabolito del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ó 2) la desaminación de la glutamina (Purves, 2006).

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

Figura 1



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

La GAD es una enzima citosólica mientras que el glutamato es sintetizado en la mitocondria, por lo que es necesario un transporte o derivación del precursor de un compartimento a otro para garantizar la producción de GABA. La GAD es crítica para el control de la excitabilidad neuronal, ya que la disminución de su actividad favorece la aparición de convulsiones (Tapia et al, 1975) y es blanco en el tratamiento de algunas epilepsias (Foster y Kemp, 2006; Wu et al, 2007). Esta enzima tiene como cofactor a un derivado de la vitamina B6, el fosfato de piridoxal (PLP; por sus siglas en inglés). La GAD está presente en las neuronas en dos formas, las cuales se encuentran codificadas por dos genes distintos. De acuerdo con su peso molecular las isoformas son distinguidas como GAD65 y GAD67. Estas enzimas exhiben algunas diferencias en su distribución molecular, lo que sugiere que estas dos formas de GAD pueden regular diferentes vías de síntesis de GABA. Estas GADs difieren significativamente en su afinidad por el PLP: la

GAD65 muestra una alta afinidad al cofactor, en tanto que la GAD67 posee una débil interacción con el PLP. La GAD65 es una enzima cuya actividad es rápida y eficientemente regulada. La GAD67 se regula a nivel transcripcional y su expresión depende de la excitabilidad de la neurona (Tapia y Sandoval, 1971; Covarrubias y Tapia, 1980). La GAD no está presente en neuronas en las que el ácido glutámico es utilizado como neurotransmisor, es decir, las neuronas glutamatérgicas no utilizan al GABA como neurotransmisor (Paul, 1995).

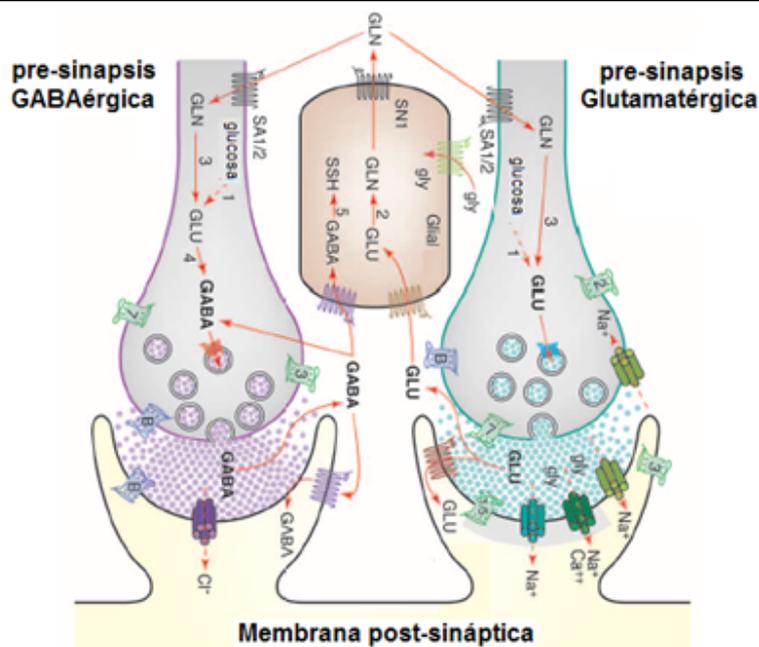
1.2 Recaptura del GABA

Estudios farmacológicos han mostrado que el GABA después de ser liberado por la terminal nerviosa es capturado nuevamente por las neuronas y por la glía. Su recaptura depende del gradiente electroquímico del Na^+ , por lo que es dependiente de la actividad de la $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ (Purves, 2006). Además, la glía tiene capacidad de almacenar GABA. La recaptura de GABA es el mecanismo primario de la inactivación de su efecto. El transportador de GABA es una proteína de doce pasos transmembrana, tiene sitios de glicosilación, y varios sitios para ser fosforilado: uno para proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) y siete para proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), por lo que el proceso de recaptura es modulado por la actividad de segundos mensajeros (Bowery, 1990; Nelson et al, 1990). Actualmente, se distinguen tres tipos de transportadores de GABA. Uno de ellos es expresado en forma específica por neuronas (SA1/2), otro lo expresan únicamente las células gliales (SN1) y el tercero es común para ambos tipos de célula (Guastella et al, 1990; Liu et al, 1992; Fig. 2).

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

sináptica o por reducción de la excitabilidad de la célula post-sináptica (Kuriyama et al, 1993).

Figura 2



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

1.3 Fisiología del sistema GABAérgico

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

A nivel post-sináptico, el mecanismo principal se debe a un rápido incremento en la conductancia al Cloro (Cl^-), lo cual tiene un efecto

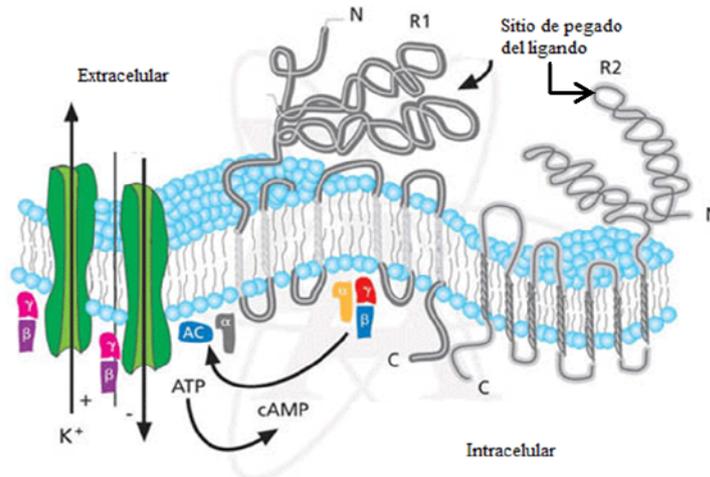
hiperpolarizante de la membrana neuronal. Además, en algunas neuronas se incrementa una conductancia lenta de Potasio (K^+) fortaleciendo la hiperpolarización (Purves, 2006). A todo el evento postsináptico se le denomina potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP por sus siglas en inglés; Borman, 1988; Krnjević, 1991; 1997). Se ha demostrado que durante la activación prolongada de los receptores de GABA en la dendrita, la respuesta de la membrana post-sináptica cambia de hiperpolarización a despolarización (Staley y Proctor, 1999). Una explicación para el cambio del efecto inhibitor del GABA es la siguiente: el incremento del flujo de Cl^- y bicarbonato (HCO_3^-) a través del receptor ionotrópico tipo A para GABA ($GABA_A$) incrementa la concentración de estos aniones en el interior de la célula, por lo que disminuye su fuerza electroquímica y en consecuencia su flujo al interior de la neurona también disminuye. Además, al cambiar su potencial de equilibrio, se favorece un egreso del HCO_3^- , produciendo un evento despolarizante (Grover et al, 1993). Esta despolarización disminuye el bloqueo dependiente de voltaje del receptor NMDA (N-metil D-Aspartato) del ión magnesio, por lo que esta actividad mediada por GABA es suficiente para la activación sináptica del receptor NMDA (Staley et al, 1995). De tal forma, que las respuestas post-sinápticas GABAérgicas en neuronas corticales pueden consistir en una temprana “hiperpolarización somática” (también denominada respuesta h- $GABA_A$) y una respuesta “despolarizante dendrítica” (o respuesta d- $GABA_A$; Bonnet y Bingmann, 1995). En conclusión, los flujos de HCO_3^- contribuyen a la respuesta d- $GABA_A$, en tanto que la respuesta h- $GABA_A$ es principalmente debida a Cl^- (Perkins y Wong, 1997).

Los efectos del GABA a nivel pre y post-sináptico son consecuencia de su interacción en la membrana a través de proteínas receptoras. Los receptores para el GABA están divididos en dos grandes grupos, uno asociado a proteínas G y nucleótidos cíclicos, denominado tipo B o $GABA_B$ o de tipo metabotrópico. El otro es el ya mencionado $GABA_A$ o de tipo ionotrópico, el cual es de gran interés para ésta tesis, por tal motivo hablaremos más detalladamente de éste receptor. Un subgrupo de receptores $GABA_A$ ha sido denominado $GABA_C$ y se encuentra principalmente en retina.

1.4 El receptor GABA_B

El receptor GABA_B es una proteína de aproximadamente 80 kDa (Ohmori y Kuriyama, 1991) con siete dominios transmembranales. Es miembro de la familia de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (específicamente Gi y Go; Soltesz et al, 1988; Kaupmann et al, 1997). Su agonista selectivo es baclofén y el ácido 3-amino propil fosfonato; en tanto que los antagonistas selectivos de este receptor son el saclofén y el faclofén (Kerr et al, 1987; Karlsson et al, 1988). El receptor GABA_B se encuentra en ambas membranas sinápticas: a nivel presináptico es el receptor que permite la disminución en la liberación de neurotransmisores por un bloqueo en el ingreso del Ca²⁺ a la terminal sináptica vía proteínas G, de tal forma que al ser activado inhibe la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Thompson y Gahwiler, 1992). En la región post-sináptica la activación de éste receptor induce el incremento en la conductancia a K⁺ (Fig. 3), lo que se identifica como la porción lenta del potencial post-sináptico inhibitorio (IPSP, por sus siglas en inglés; Deutch y Roth, 1999). El receptor GABA_B no está involucrado en la cascada de segundos mensajeros dependientes de proteína Gq-Ip3/Ca²⁺ (Komatsu, 1996; Tareilus et al, 1994).

Figura 3



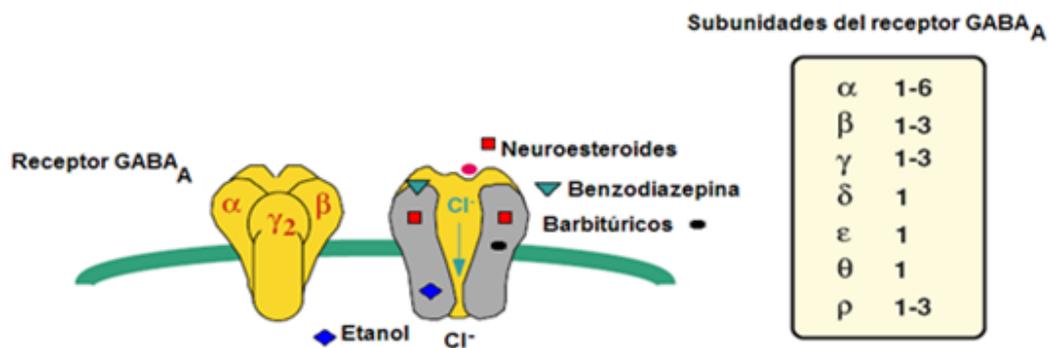
Receptor GABA_B. Receptor metabotrópico formado de dos heterodímeros cada uno de siete dominios transmembranales, acoplado a proteínas tipo G. R1, R2 representan el sitio de pegado del ligando (GABA), al activarse el receptor pre-sináptico bloquea los canales voltaje dependientes de Ca²⁺ en tanto que el post-sináptico favorece las conductancias de K⁺ (Modificado de Purves, 2006)

1.5 El receptor GABA_A

El receptor GABA_A, es un receptor ionotrópico, tiene una composición semejante a la de los receptores ionotrópicos de la acetilcolina (nicotínico), de la glicina y la serotonina (5-HT₃). Estas proteínas están formadas por subunidades (Fig. 4), por lo que las familias de estos receptores presumiblemente derivan de genes similares. El receptor GABA_A es un complejo molecular integrado como heteropentámero de peso aproximado entre 275 a 400 kDa (Hevers y Luddens, 1998; Macdonald y Olsen, 1994; Sieghart et al, 1999).

El estudio de la estructura molecular del receptor GABA_A ha permitido caracterizar a las subunidades que lo forman. Estas proteínas se denominan con las letras griegas: alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) épsilon (ϵ), rho (ρ) y theta (θ); además, es posible distinguir diversos tipos: 6 diferentes subtipos de α ; 3 distintas β , 3 tipos de γ , 1 forma de δ , 1 de tipo ϵ , 3 formas de ρ y un solo tipo de θ (Kardos, 1999; Chebib y Johnston, 1999; Fig. 4). Cada subunidad tiene su dominio N-terminal del lado extracelular, el cual puede ser el sitio de unión de varias moléculas.

Figura 4



Representación del receptor GABA_A. Este receptor ionotrópico es un complejo proteico alostérico reconocido por diferentes ligandos y en sitios distintos. Al ser activado permite el ingreso de Cl⁻ a la célula, lo cual favorece un efecto hiperpolarizante. Su estructura es heteropentamérica, compuesta por 5 de 7 clases diferentes de subunidades, algunas cuentan con variables funcionales (Modificado de Mohler, 2006).

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

Basándose en esta heterogeneidad de isoformas, el ensamble variable de las subunidades otorga diversidad en las propiedades biofísicas y farmacológicas del receptor. A partir de esta variedad de subunidades se puede calcular una combinación de más de 10 000 isoformas posibles del receptor GABA_A, aunque no todas son funcionales (Wafford et al, 1994; Araki et al, 1992a; Wang et al, 1992; Zhang et al, 1992; Bovolin et al, 1992; Araki et al, 1992a y b).

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

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

1.6 Modulación del GABA_A por otros compuestos

El receptor GABA_A es una proteína heteropentámera que posee propiedades alostéricas. Esto significa que sus propiedades de receptor pueden ser moduladas por la unión de otros compuestos que no se unen al mismo sitio que reconoce al GABA. Ciertos fármacos hacen más eficiente la transmisión GABAérgica, incrementando la frecuencia de apertura del receptor/canal o cambiando el tiempo de apertura del canal. Ejemplos de estos moduladores son los neuroesteroides, el alcohol, los barbitúricos y las Bzs, ya que estas moléculas se unen al receptor en un sitio distinto al del GABA potenciando su actividad, por ejemplo, desplazan la función concentración-respuesta de GABA hacia a la izquierda (Hadingham et al, 1992; McKernan y Whiting, 1996). Específicamente, las Bzs son moduladoras alostéricas positivas de las corrientes de Cl⁻ ya que incrementan la frecuencia de apertura del canal pero no la duración de los estados abiertos, en tanto que los barbitúricos alteran las características de las corrientes GABAérgicas incrementando la duración de las aperturas del canal. De tal forma que el resultado neto de la presencia de barbitúricos o Bzs o ambos es el incremento de la inhibición neuronal (Macdonald y Olsen, 1994; Kardos, 1999). Las Bzs tienen su sitio de unión en el receptor al nivel de las subunidades α y β . Sin embargo, quien confiere la afinidad por las mismas es la subunidad γ , principalmente el subtipo 2 (γ 2). El efecto alostérico de las Bzs es uno de los más estudiados. Una particularidad farmacológica más, es que para que el efecto de las Bzs se lleve a cabo, el GABA debe estar presente (Bureau y Olsen, 1990; Knapp et al, 1990).

La bicuculina (Bic), un potente convulsivante, disminuye la unión del GABA al receptor de manera competitiva. Los antagonistas del receptor GABA_A mejor estudiados son el t-butilbiclofosforotionato (TBPS), y la penicilina, que bloquea el

poro (Ruano et al, 1991; Costa, 1987; Macdonald y Olsen, 1994; Chebib y Johnston, 1999). En tanto que agonistas selectivos de este receptor son la isoguvacina y el muscimol.

1.7 Distribución del GABA_A en el SNC

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

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

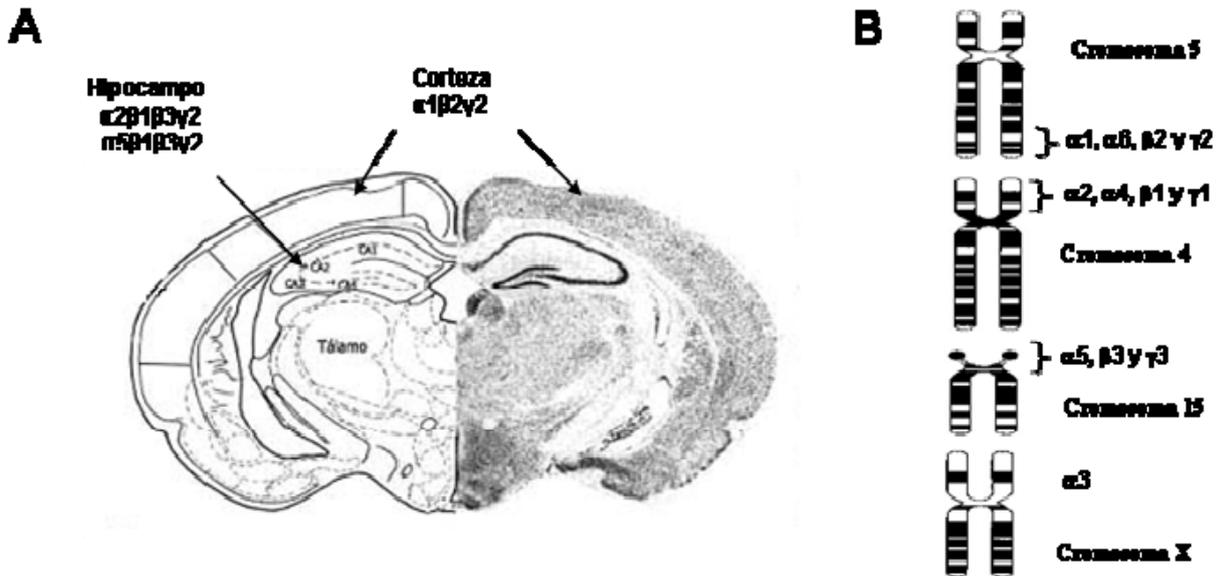
Exceptuando a las subunidades ρ que se expresan únicamente en la retina y las π que se encuentran en timo, pulmón, próstata y útero, las otras subunidades se expresan ampliamente en el cerebro. El receptor GABA_A de la retina es farmacológicamente insensible a Bic aunque es sensible a picrotoxina (Macdonald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

Estudios de biología molecular han permitido el mapeo de algunas subunidades del receptor GABA_A en el genoma humano. Por ejemplo, los genes que codifican a las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$ y $\gamma 2$ se encuentran en el cromosoma 5

en las regiones q32-q33. En tanto que las subunidades α_2 , α_4 , β_1 y γ_1 se encuentran en el cromosoma 4p13-q11, en el caso de la subunidad α_5 , β_3 y γ_3 se encuentran en el cromosoma 15 en sus regiones q11-q13. La subunidad α_3 se encuentra codificada en un gen que reside en el cromosoma X (Thompson et al, 1992; Wilcox et al, 1992; Fig. 5).

No obstante que los ARNm (ácidos ribonucleicos mensajeros) que traducen para las subunidades del receptor GABA_A se encuentran en casi todo el cerebro, pueden distinguirse distribuciones heterogéneas en algunas regiones del SNC. Por ejemplo, las células granulares del cerebelo expresan casi exclusivamente la subunidad α_6 , en tanto que la subunidad α_1 se expresa principalmente en neocorteza y cerebelo, dejando únicamente el 5% de todos los receptores GABA_A para la expresión de la α_5 en hipocampo, corteza cerebral, amígdala y el bulbo olfatorio. En corteza cerebral son muy comunes las subunidades α_1 -4, al igual que la isoforma β_2 , en tanto que las subunidades β_1 y 3 son más comunes en el hipocampo, en la corteza cerebral y en el cerebelo. Por otra parte, las subunidades β_4 y γ_4 se han descrito solamente en el cerebro del pollo. Es interesante que la subunidad γ_1 se expresa predominantemente en la amígdala del lóbulo temporal y el septum, la variante γ_2 se encuentra prácticamente en todo el cerebro, y es muy común localizarla en presencia de β_2 y α_1 (Essrich et al, 1998), la subunidad γ_3 esta presente en la corteza y el estriado. La triple combinación $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ conforma la población más frecuente del receptor GABA_A en corteza cerebral, en comparación con el hipocampo en donde es común la expresión de las subunidades $\alpha_2\beta_1\beta_3\gamma_2$ y $\alpha_5\beta_1\beta_3\gamma_2$ (McKernan y Whiting, 1996). La subunidad γ_2 tiene dos isoformas: larga (γ_2L) y corta (γ_2S ; por sus siglas en inglés), la subunidad γ_2S es más abundante que la γ_2L en el hipocampo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio, en contraste en el colículo inferior, el bulbo y en el cerebelo se expresa más γ_2L que γ_2S . La subunidad δ está predominantemente en el cerebelo. En tanto que la subunidad ϵ está presente en amígdala, tálamo y núcleos subtalámicos (Hevers y Luddens, 1998; Mehta y Ticku, 1999; Mohler, 2006).

Figura 5



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

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

Se puede realizar una subdivisión farmacológica del receptor GABA_A en relación con el efecto y la unión de las Bzs. El receptor tipo I (BZI), une con mayor afinidad a la trizolopiridazina (CI 218 872), en tanto que el receptor tipo II (BZII) une con gran afinidad al 1,4 Bz: 2 oxo-quazepam. El receptor BZI abunda en cerebelo, en tanto que el BZII se encuentra en casi todo el cerebro. Para otro tipo de fármacos, como el TBPS, la unión al receptor estructurado con $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ es muy grande, en tanto que para algunos esteroides se ha identificado que la presencia de $\beta 2 \gamma 2$ con cualquier isoforma de $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ es importante para una modulación positiva más potente (Fritschy et al, 1992; Puia et al, 1993).

Diversos estudios indican que la fosforilación del receptor GABA_A modifica las corrientes de Cl⁻ inducidas por GABA, Bzs y alcohol. La fosforilación puede incrementar (Stelzer et al, 1988; Browing et al, 1990) o disminuir estas corrientes (Leidenheimer et al, 1992; Leidenheimer y Chapell, 1997), modificando la cinética

de activación y el proceso de desensibilización del receptor. Esta modulación por fosforilación depende de distintas enzimas derivadas de diversos segundos mensajeros como la PKA, la PKC y por la proteína Ca^{2+} -calmodulina-cinasa. El blanco de estas fosforilaciones son los residuos de serina de las asas que comunican a TM3 y TM4 de las subunidades β del receptor. De esta forma, la actividad de este receptor ionotrópico puede ser modulada por señales externas e internas (Lambert y Harrison, 1990; Krishek et al, 1994; Bureau y Laschet, 1995; Zhai et al, 1998; Churn y DeLorenzo, 1998).

Los cambios en la neurotransmisión GABAérgica tienen un papel preponderante en la fisiopatogénesis de diversos trastornos neuronales como la epilepsia, los síndromes de abstinencia, entre otros. Estos trastornos tienen como característica principal el incremento de la excitabilidad neuronal, esta hiperexcitabilidad es consecuencia de alguno de los siguientes eventos que pueden surgir solos o asociados entre ellos: a) modificaciones en la síntesis del GABA, b) disminución en la liberación del GABA, c) cambios en la recaptura del GABA, d) modificaciones en la estructura del receptor, e) cambios en el número de receptores, y finalmente, f) cambios en la afinidad del receptor GABA_A (Silva-Barrat, 1989).

2. Síndromes de Abstinencia asociados con la neurotransmisión GABAérgica

A través de la existencia de nuestra humanidad, las sociedades han consumido sustancias que alteran el estado de ánimo, la percepción, el funcionamiento cognoscitivo y la conducta, por ejemplo: el alcohol, la nicotina y la marihuana, entre muchos otros fármacos. Además, en algunos casos, el progreso en el conocimiento farmacológico ha llevado consigo nuevos fármacos que propician modificaciones en el funcionamiento del SNC, como es el caso de los psicotrópicos. Diversos agentes neurofarmacológicos utilizados con un fin terapéutico pueden cambiar la conducta del paciente generando estados de tolerancia y dependencia física e intelectual.

2.1 Tolerancia y dependencia

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

Actualmente se distinguen varios tipos de tolerancia que pueden subclasificarse en cuatro: 1) tolerancia farmacocinética, 2) tolerancia farmacodinámica, 3) tolerancia aguda y 4) tolerancia cruzada. Está última incluye una forma de tolerancia conductual que también se llama tolerancia condicionada (Cox y Marshn, 1983; Feldman et al, 1996).

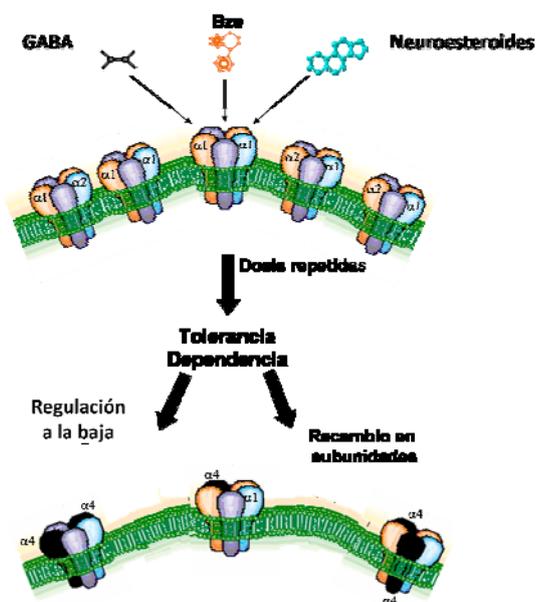
El término de tolerancia farmacocinética o de eliminación se refiere a los cambios de distribución o metabolismo del fármaco después de la administración repetida, de modo que hay concentraciones plasmáticas reducidas en la sangre y, de manera subsiguiente, en los sitios de acción de dicho fármaco. El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

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

De manera adicional a los tres tipos básicos de tolerancia, la tolerancia aguda se refiere a aquella que se genera rápidamente tras el empleo de un

fármaco en una sola ocasión. El ejemplo típico de este tipo de tolerancia es el producido por la administración de cocaína. Si se administra repetidamente, los efectos de dosis subsiguientes disminuyen en cuestión de horas y a lo largo de la misma sesión (Lader y File, 1987).

Figura 6



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

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

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

La dependencia es un término clínico que se refiere a un estado de adaptación (tolerancia) producido por el reajuste de los mecanismos homeostáticos ante la administración repetida de una sustancia (Fig. 6). El fármaco puede afectar múltiples sistemas que antes estaban en equilibrio. La persona en estado de dependencia física o adaptada, requiere de una administración sostenida del fármaco para desempeñar sus actividades normales. Si en forma repentina, esta sustancia deja de administrarse, ocurrirá un desequilibrio brusco, y los sistemas afectados deberán someterse de nuevo a un proceso de reajuste hasta alcanzar un nuevo equilibrio sin la sustancia (O'Brien, 1996).

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

Tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia son procesos biológicos que resultan como consecuencia natural del consumo y retiro de ciertos fármacos o drogas. Estos fenómenos se pueden producir en animales de experimentación y puede ser un correlato del evento que se registra en el humano.

2.2 Mecanismos moleculares de la génesis de los síndromes de abstinencia

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

Trabajos previos (Uusi-Oukari, 2010) señalan que los cambios en la expresión de la subunidad $\alpha 4$ son fundamentales en la génesis de algunos tipos de epilepsias y en el inicio de las abstinencias a Bzs y neuroesteroides. Por ejemplo: los niveles de ARNm de esta subunidad se incrementan 4 h después de la primera crisis epiléptica inducida por kindling en la amígdala del lóbulo temporal (Clark et al, 1994). Crisis inducidas por ácido kaínico también muestran este fenómeno de regulación a la alta en la subunidad $\alpha 4$ (Tzunashima et al, 1997). Electrochoques repetidos también generan un incremento en la expresión del ARNm de esta subunidad (Clark, 1998). Además, durante la abstinencia a la alopregnanolona (AloP) y a la progesterona, aparece un incremento en la expresión de la isoforma $\alpha 4$. La terapia antisentido contra el ARNm de esta subunidad previene el síndrome de abstinencia a los neuroesteroides (Smith et al, 1998). En tanto que un tratamiento crónico con etanol induce una disminución en la expresión del mRNA de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 6$ e induce un incremento de la expresión de $\gamma 3$ (Buck et al, 1991). Durante la abstinencia alcohólica se ha determinado también que las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 5$ disminuyen en su expresión en neuronas de la corteza cerebral, además de que hay cambios en la fosforilación del receptor (Mhatre y Ticku, 1992). Un tratamiento prolongado con muscimol en cultivos de neuronas, reduce la expresión del ARNm de la subunidad $\alpha 1$ (Hirouchi et al, 1992); el tratamiento simultáneo con Bic bloquea este fenómeno. Las β -carbolinas, antagonistas del receptor GABA_A, inducen un incremento en la expresión de la subunidad δ del receptor GABA_A en cultivos de neuronas (Doble y Martin, 1996).

Un aspecto interesante que sustenta la hipótesis de este trabajo es el siguiente: existen fármacos como las Bzs y los neuroesteroides que reconocen al receptor GABA_A y el tratamiento prolongado genera cambios en la expresión de sus subunidades de este receptor. También puede haber cambios en el número de receptores, disminuyendo su número (regulación a la baja) o incrementándolo (regulación a la alta). Esto debe modificar la sensibilidad farmacológica, lo que determina cambios en la excitabilidad del tejido.

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

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

Todos estos cambios moleculares en el receptor GABA_A, son los responsables de las modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica, la cual es fundamental para la modulación de la conducta sexual de Las ratas a través de diferentes estructuras cerebrales (mPOA, VTA, VMH, etc., Fernández-Guati et al, 1986; Frye y Paris, 2009). De esta manera, es imprescindible estudiar el efecto de la abstinencia a Dz (que modula la neurotransmisión GABAérgica) sobre la conducta sexual.

3. Conducta Sexual

3.1 Etapas de la cópula de la rata

La conducta sexual de la rata macho es probablemente de las conductas mejor descritas en la actualidad. La conducta sexual macho se distingue en actividades que se conocen como precopulatorias, copulatorias y postcopulatorias. Durante la conducta precopulatoria, el macho y la hembra se persiguen, se

olfatean la región anogenital, rozan sus cuerpos entre sí y emiten vocalizaciones ultrasónicas (Lucio, 2008). De este modo, ambos reciben estimulación olfativa, táctil y auditiva. Además, la hembra estimula al macho con conductas que se conocen como proceptivas y que consisten en mover rápidamente las orejas, correr en zig-zag o dar pequeños saltos. La duración de la conducta precopulatoria es variable, puede ser extremadamente corta (pocos segundos) o larga (algunos minutos Lucio, 2008).

Por otro lado, la conducta copulatoria implica la ejecución de diversas posturas y movimientos que permiten la inserción peneana y la expulsión seminal. Tales movimientos copulatorios se conocen como patrones conductuales copulatorios (Lucio, 2008).

La última etapa de la cópula de la rata es la conducta post-copulatoria. Ésta fase comprende el periodo refractario absoluto y el relativo. Durante el periodo refractario absoluto el macho presenta poca locomoción, incluso tiene la apariencia de estar dormido. El macho es insensible a cualquier estímulo sexual y del medio ambiente (Lucio, 2008). Durante el periodo refractario relativo, el macho comienza a responder a los estímulos que lo rodean y emite vocalizaciones ultrasónicas. La duración de ésta conducta varía en minutos. El periodo refractario, tanto el relativo como el absoluto aumentan su tiempo a medida que aumenta el número de series eyaculatorias realizadas por el macho (Lucio, 2008).

3.2 Patrones conductuales copulatorios

Los patrones conductuales que realiza la rata macho durante la cópula son tres y se conocen como monta, intromisión y eyaculación. La monta se identifica cuando la rata macho se coloca sobre la hembra quedando sus regiones pélvica y perineal apoyadas sobre la grupa femenina. Con las extremidades delanteras sujeta a la hembra y le palpa los flancos. Al mismo tiempo realiza movimientos pélvicos rítmicos hacia adelante y hacia atrás (Lucio, 2008).

Posteriormente, el macho realiza una desmonta lenta. La sujeción y la palpación de los flancos producen en la hembra el reflejo de lordosis (arqueamiento del dorso que se acompaña de la elevación de la cabeza, la grupa

y la desviación de la cola). El macho debe realizar la palpación y sujeción de los flancos más los movimientos pélvicos para que el patrón copulatorio se reconozca como monta (Lucio, 2008).

Después de la primera monta suelen ocurrir otras con cierta regularidad, en algunas de las cuales se observa que el macho despliega el patrón copulatorio de intromisión. La intromisión implica la monta más la inserción del pene en la vagina. El patrón copulatorio se identifica cuando el macho realiza un movimiento pélvico de penetración, luego se desmonta bruscamente hacia atrás y se autoacicala el pene (Lucio, 2008). Durante la penetración, el macho no realiza movimientos pélvicos. Después de la primera intromisión el macho ejecuta otras montas e intromisiones de forma intercalada.

Las intromisiones propician que el macho alcance su umbral de eyaculación, el cual oscila entre las 6-12 intromisiones, es entonces cuando el macho expele el semen, desplegando el patrón copulatorio de eyaculación. Durante la eyaculación, el macho monta a la hembra y cuando despliega el último de los movimientos pélvicos, este se caracteriza por ser más profundo y duradero que el de una simple inserción del pene. Ya que en ese momento expele y deposita el semen en la vagina. Inmediatamente después, el macho eleva la porción superior del cuerpo, extiende hacia atrás, las extremidades anteriores y se desmonta lentamente para luego autoacicalarse los genitales, particularmente el pene. A este conjunto de montas e intromisiones que culminan con la eyaculación se les conoce como serie eyaculatoria (Lucio, 2008).

Después de cada eyaculación, el macho presenta la conducta postcopulatoria. Esta conducta comprende el periodo refractario absoluto y relativo ya descrito previamente. Este intervalo aumenta a medida en que haya más series eyaculatorias (Lucio, 2008).

Por otro lado, el ciclo estral de la rata dura cuatro días y comprende diferentes etapas: metaestro, diestro, proestro y estro. Durante estos días, la concentración de hormonas esteroides estradiol (E) y progesterona (P) que producen sus ovarios fluctúa, pero la concentración máxima de ambas, ocurre durante el proestro poco antes de la ovulación. Entonces una rata inicia la

conducta del estro desde la noche del día del proestro cuando el pico máximo de las hormonas ováricas están presentes, en estas condiciones el estro es natural, sin embargo, también puede ser inducido farmacológicamente. Una hembra receptiva o en fase de estro es aquella que está dispuesta a tener un encuentro copulatorio (Lucio, 2008).

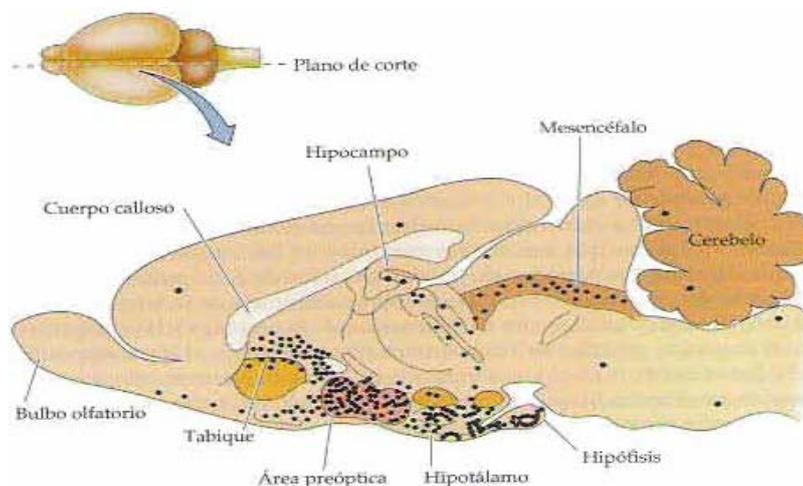
El estro puede ser inducido mediante la administración de hormonas sintéticas a hembras ovariectomizadas. Las hembras con estro inducido hormonalmente muestran receptividad durante aproximadamente 6-8 horas. Esto es muy importante ya que una rata hembra sólo puede copular durante el estro natural o inducido. En esta fase es cuando la hembra puede presentar el reflejo de lordosis, que es la dorsiflexión de la columna vertebral, la elevación de la cabeza y la grupa y desviación de la cola. Con esta postura queda expuesto el orificio vaginal facilitando que el macho introduzca el pene en la vagina (Lucio, 2008).

3.3 Hormonas esteroides sexuales

Las hormonas esteroides sexuales, incluidos testosterona, progestágenos y estrógenos, son derivados de un mismo precursor común, el colesterol. Tanto hombres como mujeres sintetizan estas hormonas, pero en proporciones diferentes. Ambos sexos también tienen receptores para andrógenos y estrógenos, aunque hay algunas diferencias regionales en el cerebro de cada sexo en la densidad de los receptores (Purves 2006).

Dado que los esteroides sexuales son lípidos, son permeables para la célula. Sin embargo, las neuronas tienen la capacidad de seleccionar, concentrar y retener esteroides específicos por medio de receptores y proteínas fijadoras tanto en el citoplasma como en el núcleo. Diferentes áreas del encéfalo adulto tienen distintos patrones de receptores de esteroides, con distribuciones superpuestas de ambos receptores. Por lo tanto, regiones específicas pueden ser blancos de las acciones de diferentes esteroides (Fig. 7).

Figura 7



Distribución de las neuronas sensibles al estradiol en un corte sagital en el cerebro de la rata. En la rata la mayor parte de las neuronas sensibles a estradiol (puntos negros en la figura) se localizan en el área preóptica, el hipotálamo y la amígdala (no mostrada por el corte; tomado de Purves 2006).

Algunas neuronas expresan receptores para más de un esteroide y en consecuencia, las hormonas pueden tener un efecto sinérgico. Por ejemplo, todas las neuronas que expresan receptores para E también expresan receptores para P, si bien se pueden aumentar algunos comportamientos reproductivos femeninos mediante los estrógenos aislados (como la proceptividad de las ratas), el comportamiento se facilita mucho cuando existe aplicación i.p. secuenciada de E y P en la rata (Purves 2006).

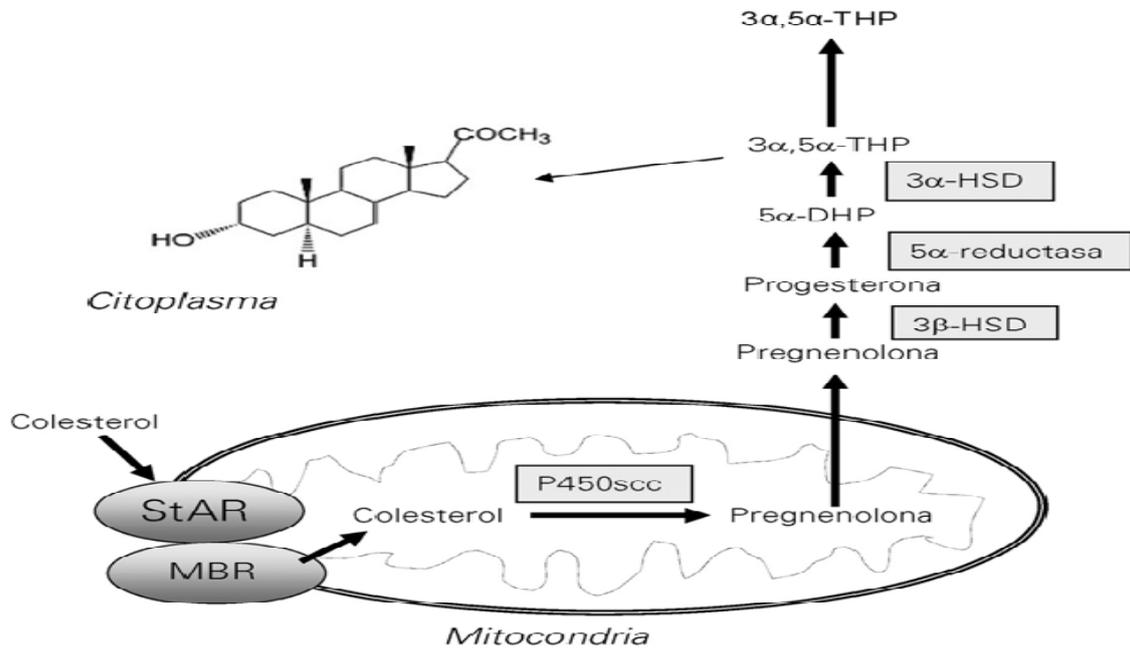
3.4 Neuroesteroides

Los neuroesteroides son una subclase de esteroides que pueden sintetizarse en el SNC *de novo* a partir del colesterol y pueden modular la actividad GABAérgica (Fig. 8). En cambio, el término “esteroide neuroactivo” se refiere a esteroides que, independientemente de su origen, son capaces de modificar actividades neuronales (Martín-García, 2007).

Una fuente de alopregnanolona (AloP, 3α , 5α -HTP) que es un neuroesteroide muy potente en el cerebro, es su biosíntesis a través de las células gliales. La proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) podría

interactuar con el receptor periférico de benzodiazepinas (MBR) para facilitar el transporte del colesterol del exterior al interior de la membrana mitocondrial formando pregnanolona por el complejo enzimático citocromo P450_{scc}, luego se metaboliza por 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD) a P y con las enzimas antes mencionadas a AloP. Esta síntesis de *novo* de pregnanolona en el cerebro ocurre independiente de la secreción de las glándulas periféricas y en respuesta a los estímulos reproductivos relevantes, por ejemplo, el apareamiento aumenta rápidamente la AloP en el cerebro medio y esto se observa entre ratas intactas receptoras así como en Ovx y en roedores adrenalectomizadas pretratadas con E. Aumentando o disminuyendo la neuroesteroidogénesis de AloP con infusiones de ligandos MBR, respectivamente, aumenta y atenúa la lordosis de roedores pretratados con E/P o naturalmente receptoras. La inhibición de la actividad la P450_{scc} en el cerebro produce disminución en AloP y con ello de lordosis (Martín-García, 2007).

Figura 8.



Biosíntesis de los neuroesteroides moduladores del receptor GABA_A. Se muestra la ruta de síntesis de la AloP (3α,5α-THP) desde el colesterol. La proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) podría interactuar con el receptor periférico de benzodiazepinas (MBR) para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial. p450scc: citocromo p450; 3α ó 3β-HSD: 3α ó 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5α-DHP: 5α-dihidroprogesterona. (tomado de Martín-García, 2007).

Un ejemplo de esteroides neuroactivos son las progestinas (progesterona, pregnenolona, etc.), las cuales son secretadas por los ovarios y las glándulas suprarrenales, éstas son metabolizadas centralmente por acciones de las enzimas 5α-reductasa (5α-R) y 3-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3-HSOR; Stoffel-Wagner, 2003). Sin embargo, los metabolitos periféricos se metabolizan rápidamente en el hígado; la P puede tener efectos en el cerebro por su rápida conversión a AloP por las numerosas células gliales (Souza et al, 2008).

Algunos de los efectos de la P para facilitar la lordosis puede deberse en parte a las acciones de la AloP. Existen datos que demuestran que los niveles de P y AloP son elevados en el mesencéfalo de ratas receptoras. Niveles de AloP en lugar de P, tienen una correlación más positiva con el inicio de las respuestas de la lordosis natural en ratones receptoras. La AloP es la más eficaz de todas las progestinas para facilitar la lordosis (Frye, 2001).

3.5 Regulación de receptores GABA_A a través de neuroesteroides.

Ciertos neuroesteroides, y en particular los derivados de 3 α de la progesterona, se comportan como moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA_A. Se ha demostrado que la activación de la AloP, es 20 veces más potente que las Bzs y 600 veces más que los barbitúricos sobre la activación del receptor GABA_A. La modulación positiva que tiene este metabolito sobre el receptor GABA_A es a través de un aumento en la duración de apertura del canal de Cl⁻, además, como las Bzs, aumentando su frecuencia de apertura (Martín-García, 2007).

Los efectos de la AloP sobre los receptores GABA_A dependen en parte de las subunidades que conforman al receptor. Así, aunque la AloP modula todos los tipos de composiciones de subunidades del receptor GABA_A identificadas hasta el momento, se ha descrito que aquellas que contienen la subunidad δ (en lugar de la habitual γ) son especialmente sensibles a la modulación alostérica positiva (Martín-García, 2007).

Los neuroesteroides como la AloP exhiben propiedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, analgésicas y sedativas, características acordes con la presencia específica de un sitio de unión en al receptor GABA_A (Martín-García, 2007).

4. Benzodiazepinas (Bzs) y Farmacología del Diazepam (Dz)

4.1 Abstinencia a Bzs

En 1955, Sternbach sintetizó al clordiazepóxido, el patrón de acciones de este fármaco fue descrito por Randal (Martín, 1987). Pero fue hasta 1961 cuando el clordiazepóxido fue introducido en la clínica con el nombre de "librium", marcando con ello el comienzo de la era de las Bzs (Sternbach, 1979). Hasta la fecha se han sintetizado más de 3000 compuestos benzodiazepínicos, de los cuales a 120 se les han probado su actividad biológica y cerca de 35 se encuentran en uso clínico. La mayor parte de las Bzs que se utilizan se han seleccionado por su alto potencial ansiolítico, capacidad de sedación, efectos anticonvulsivos y de relajación muscular, estos efectos se explican por su función

depresora de la actividad del SNC (Shader y Greenblatt, 1981; Mark y Waltzman, 1999; Ribeiro et al, 2007). Las Bzs son fármacos que incrementan la actividad del receptor GABA_A, ejerciendo una modulación alostérica positiva en el receptor (Shader y Greenblatt, 1981; Llorente et al, 2000). La unión entre las Bzs y el receptor GABA_A tiene como resultado un incremento de las conductancias de Cl⁻. Esta facilitación de las conductancias de Cl⁻ inducidas por GABA resulta en una hiperpolarización de las neuronas, permitiendo una disminución de la transmisión sináptica (Squires, 1983; Mark y Waltzman, 1999). Los receptores GABA_A, que contienen las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ ó $\alpha 5$ en combinación con las subunidades β y $\gamma 2$, son los receptores más abundantes; en el cerebro, los receptores con expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 6$, no responden clínicamente al Dz, flunitrazepam, clonazepam y zolpidem (Pirker et al, 2000; Mohler, 2006). El efecto anticonvulsivo, sedativo, ansiolítico o hipnótico de las Bzs es mediado por los receptores GABA_A cuya conformación se basa principalmente en las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Mohler et al, 2002; Mohler, 2006).

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

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

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

aparece con convulsiones y delirio (Doble y Martin, 1996). Es difícil distinguir entre los síntomas de la abstinencia y la reaparición de la ansiedad que motivó la prescripción de las Bzs.

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

4.2 Farmacología del Dz

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

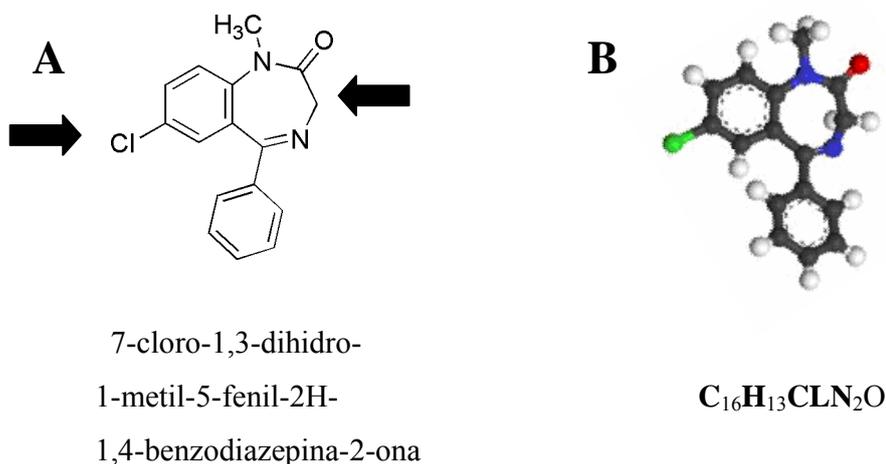
Se ha demostrado que la actividad registrada en el EEG, después de la aplicación de Dz, presenta un incremento en la actividad de ondas beta y un decremento de la actividad de ondas alfa o lentas, estos cambios en la actividad beta han sido correlacionados con su efecto anticonvulsivo (Mandema y Danhof, 1992; Jongasma et al, 2000). La administración del Dz en el hombre incrementa los niveles de testosterona en el plasma y de corticosterona en ratas, además en células glomerulosas adrenales bovinas inhibe la producción de aldosterona (Papadopoulos, 1993).

La síntesis del Dz se realizó en 1959 por los laboratorios Roche, y su ingreso al mercado comercial fue en 1963. Es un derivado del 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona, cuya fórmula empírica es C₁₆H₁₃ClN₂O (Fig. 9; Mathey, 1965), su peso molecular es 284.75 kDa. Tiene un efecto menos tóxico y diez veces más potente que el librium (Sternbach, 1979). La introducción en México del Dz fue hasta el año de 1968.

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

El *riesgo de abuso* de un compuesto es la capacidad para producir una dependencia psicológica o fisiológica, en conjunto con la capacidad para alterar el comportamiento de una forma que es perjudicial al individuo o a su ambiente social (Woods y Winger, 1997).

Figura 9



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

4.3 Farmacodinamia y farmacocinética del Dz

Una característica importante del Dz es su rápida acción dentro del organismo. Por vía oral e intravenosa sus efectos comienzan en cuestión de minutos, alcanzando de 1 a 1.5 h el pico máximo en las concentraciones del plasma sanguíneo, este rango puede variar dependiendo de la edad, la alimentación y de la vía de administración, ya que por vía intramuscular es más lento. El Dz se une a proteínas del plasma y sus metabolitos (N-desmetildiazepam

y temazepam, tienen un grado de fijación del 99% aproximadamente (Goodman, 2007), los cuales pasan la barrera hematoencefálica y la placenta. La disminución de las concentraciones en el plasma después de la administración oral es bifásica (Dhillon et al, 1982).

Esta Bz primero es metabolizada por una N-desmetilación realizada por los citocromos p-450, p-3A4 y p-2C19 que se encuentran principalmente en el hígado, el N-desmetildiazepam es el metabolito más activo, éste después es hidroxilado por el citocromo p-3A4 formando el metabolito activo, temazepam, posteriormente ambos metabolitos son convertidos en oxazepam y son eliminados excretándose principalmente como conjugados glucorónicos por la orina (Goodman, 2007; Shader y Greenblatt, 1981; Olkkola y Ahonen, 2008;).

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

Durante tratamientos prolongados con Dz se genera una tolerancia farmacocinética, ya que esta Bz durante la primera aplicación induce la síntesis *de novo* del citocromo p-450, el cual facilita la tasa de biotransformación, que disminuye la actividad y la biodisponibilidad del fármaco, por tal motivo en las siguientes aplicaciones se requiere una dosis mayor para alcanzar el efecto deseado (Goodman, 2007).

4.4 El síndrome de abstinencia a Dz (SAD)

En la década de los 70's en los EUA se reportaron varios casos en los cuales la interrupción de un tratamiento prolongado con Dz producía un síndrome de abstinencia caracterizado por: un exagerado nivel de ansiedad, insomnio, sudoración profusa, pesadillas, disforia, agitación, inestabilidad emocional, temblor, dolor de cabeza, vértigo, falta de coordinación motora, hipersensibilidad sensorial, letargo, fatiga, visión borrosa, sensación facial ardiente, dolor muscular, taquicardia, alucinaciones, psicosis, deliro y en ocasiones convulsiones. (Greenblatt y Shader, 1978; Shader y Greenblatt, 1981; Petursson y Lader, 1984; Lader, 1994; Doble y Martin, 1996; Mark y Waltzman, 1999; Baptista et al, 2007).

4.5 Modificaciones Electroencefalográficas (EEG) y moleculares en la abstinencia a Diazepam (Dz)

Se sabe que el retiro abrupto de la administración de Dz en humanos altera la actividad cortical registrada a través del EEG, consecuencia de un incremento en la excitabilidad neuronal. Los cambios en el EEG se caracterizan por la disminución de las ondas de baja frecuencia durante el sueño. Dentro de la práctica clínica, el Dz es utilizado como auxiliar en el tratamiento para el Síndrome de Abstinencia al Alcohol (Vicens et al, 2006). El Síndrome de Abstinencia a Diazepam (SAD) se asemeja mucho en su inicio por evidencias en el EEG y clínicas a otras abstinencias desarrolladas por fármacos GABAérgicos. Estudios previos han demostrado que en los primeros estadios de la abstinencia a alcohol (por una modulación a través de los receptores GABA_A, al igual que en el SAD) se registra la aparición de complejos espigas-onda que presentan una alta amplitud (100-150 μ V) que caracteriza a la actividad epileptiforme (Walker y Zornetzer, 1974). Brailowsky y cols demostraron que el cese de la instilación de GABA en la corteza cerebral de ratas está asociada a la aparición de actividad epileptiforme en el sitio de la instilación, lo cual es interpretado como un signo de hiperexcitabilidad (Brailowsky et al, 1987).

Otro aspecto importante, durante el cambio de la actividad GABAérgica en el SAD es la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas inducidas por pentilenetetrazol (PTZ), el cual, es un antagonista no competitivo del receptor GABA_A. Algunos investigadores han utilizado el PTZ como un modelo para generar dichas crisis (Vlainic y Pevicic, 2009; Montiel et al, 2000). Susuki y cols en 1999, demostraron que durante el SAD, en modelos con animales, los signos de la abstinencia incluyen convulsiones espontáneas, incremento del tono muscular y un decremento en el umbral del 20-35% a presentar crisis convulsivas inducidas por convulsivantes (como el PTZ), durante la abstinencia a Diazepam (Susuki et al, 1999).

En ratas, la interrupción de tratamientos prolongados con Dz genera la aparición de irritabilidad, conducta de miedo y crisis convulsivas; además de cambios moleculares en el receptor GABA_A tales como: la disminución en la

densidad de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y un incremento en la expresión del RNAm de las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\gamma 2L$, $\gamma 2S$, $\beta 2$ y $\beta 3$ en neuronas de la corteza cerebral y el hipocampo (Impagnatiello et al, 1996; Pesold et al, 1997). Estos cambios modifican la función del receptor provocando la reducción del efecto del Dz (Follesa et al, 2001; 2003; 2004). Sin embargo, en la búsqueda de nuevas alternativas para estudiar el origen de las abstinencias a Bzs, recientemente se ha demostrado, que el sistema glutamatérgico también se encuentra modificado. Durante la abstinencia a Dz, hay cambios en la conformación de los receptores para glutamato, estos cambios son asociados a un incremento tanto en el número como en función de los receptores AMPA y una reducción (regulación a la baja) de los receptores NMDA. El incremento en la función del receptor AMPA está correlacionado con la sobreexpresión de la subunidad Glu1 (subunidad esencial para la plasticidad neuronal; Izzo et al, 2001; Allison et al, 2005). Estos mismos cambios en la neurotransmisión glutamatérgica se han encontrado en la abstinencia a flurazepam (Bz 10 veces menos potente que el Dz; Van Sickle et al, 2004; Song et al, 2007; Xiang y Tietz, 2007). No obstante, se ha identificado que dependiendo de la forma de administración del Dz, los cambios en la abstinencia son paradójicamente diferentes. La administración vía i.p. provoca en la abstinencia una reducción de la tasa de unión al receptor AMPA, además de una redugulación a la baja de este receptor. De forma opuesta la administración subcutánea, se incrementa la tasa de unión al mismo receptor AMPA. Este último efecto puede ser una respuesta neuroadaptativa hacia un incremento en la actividad excitadora (Allison y Pratt, 2006; Steppuhn y Turski, 1993).

II. Justificación

En nuestro país el registro epidemiológico exacto del control de las Bzs es insuficiente y poco confiable. El consumo de estas sustancias en la población comienza a los 12 años; se ha estimado que: el 10% del total de la población de México ingiere o tuvo contacto con alguna Bz; de acuerdo a la Encuesta Nacional de Epidemiológica Psiquiátrica en México (Medina et al, 2003), es alarmante el uso de estas sustancias en la región sur-centro del país, la cual llega al 36%. Lo anterior se resume en un problema de salud pública generando la búsqueda de estrategias farmacológicas para contrarrestar los riesgos de la adicción. Además los problemas neurológicos y sociales ocasionados por el abuso del Dz que es la Bzs más utilizada clínicamente y con mayor inducción de síndromes de abstinencia.

Es importante hacer énfasis que algunos factores de riesgo en el individuo que condicionan o favorecen al uso inapropiado de Bzs son (Minaya, 2009):

- La presencia de un trastorno de ansiedad (53.8%).
- La presencia de un trastorno de angustia (15.4%).
- Ser mujer (por padecer de 2 a 3 veces más estos tipos de trastornos, Arenas, 2009).

Planteamiento del problema

Las abstinencias a Dz o Bzs son frecuentes y sin embargo, su origen ha sido poco estudiado, asimismo se desconoce el impacto de la tolerancia y la dependencia a Dz sobre la conducta sexual de mamíferos. Con respecto a este último punto, se conoce que la actividad del receptor GABA_A es un condicionante en la manifestación de la actividad sexual (Fernández-Guasti, 1986). Bajo esta premisa, esta tesis pretende mostrar la influencia de la abstinencia a Dz sobre la conducta sexual de la rata hembra y macho mediante un estudio electrofisiológico, conductual y valorando además el perfil ansiogénico que presentan estos animales. Obteniendo con esta información las modificaciones de la excitabilidad

neuronal que tienen influencia sobre los cambios conductuales, principalmente en la conducta sexual y de ansiedad.

De esta manera conoceremos si la abstinencia a Dz causa alguna modificación a la conducta sexual en las ratas, la información obtenida podrá ser útil para apoyar futuras investigaciones clínicas o epidemiológicas.

III. Objetivo General

Realizar un análisis conductual y electrofisiológico que identifique la hiperexcitabilidad neuronal causada por el Síndrome de Abstinencia a Diazepam valorando cuantitativamente su impacto en la conducta sexual de la rata.

Objetivos Específicos

Para distinguir el efecto de los cambios en la actividad GABAérgica sobre la conducta sexual de la rata, planteamos estudiar:

- Durante el segundo día de abstinencia a Dz cuantificar el número de lordosis, así como el cociente de lordosis en las hembras y la serie eyaculatoria en ratas machos.

Para relacionar los cambios conductuales con la hiperexcitabilidad neuronal.

- Cuantificar con el Laberinto Elevado en Cruz (LEC) la ansiedad durante la abstinencia a Dz en el segundo día después de la conducta sexual.

Para estudiar el incremento en la excitabilidad neuronal que tienen la abstinencia, proponemos:

- Evaluar la susceptibilidad a inducir crisis convulsivas por aplicación de un antagonista GABAérgico (PTZ) en ratas con abstinencia a Dz.
- Cuantificar la cantidad de complejos espigas-onda que aparecen en el SAD mediante un registro electroencefalográfico.

Variables

Variable Independiente

Inducción del Síndrome de Abstinencia Diazepam (aplicación i.p. de Diazepam, 7mg/Kg durante 10 días; la latencia del síndrome es de 24h después de la última aplicación, sin embargo, su expresión máxima es 48h después de la última dosis y su duración es de 14 días).

Variables Dependientes

Evaluación de:

1. Conducta sexual en hembras: medición del número de lordosis y del cociente porcentual de lordosis (número de lordosis/número de montas).
2. Conducta sexual en machos: serie eyaculatoria (número de montas, número de intromisiones).
3. Ansiedad: a través del Laberinto Elevado en Cruz cuantificando el número de entradas a brazos abiertos y cerrados, así como el porcentaje en tiempo de permanencia en cada uno de ellos.
4. Inducción de crisis convulsivas a través del bloqueo del receptor GABA_A con PTZ en animales con abstinencia a Diazepam: latencia de la primera crisis tónico-clónica.
5. Incremento de la excitabilidad cortical en el EEG a través de cuantificar los complejos espigas-onda característicos de la abstinencia.

IV. Hipótesis

1. Si el inicio y el mantenimiento del SAD depende de una reducción en la actividad GABAérgica y esto desencadena un estado de hiperexcitabilidad neuronal entonces ¿este nuevo estado en la actividad cerebral incrementa la conducta sexual de la rata?
2. Si la hiperexcitabilidad neuronal que caracteriza el SAD modifica los estados conductuales entonces ¿induce la aparición de ansiedad?
3. El incremento en la excitabilidad cortical inducida por el SAD induce a la aparición de sincronía de disparo neuronal de la corteza frontal y parietal favoreciendo la aparición de complejos espiga-onda en el EEG.

V. Material y Método

Institución

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”. El cual tiene apoyo técnico, bioterio, fármacos, computadoras y equipo para realizar esta tesis. Asimismo, se contó con la colaboración del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM para la obtención de animales ovariectomizados y de hormonas esteroidales. Así como el apoyo del laboratorio de Neurofisiología del Control y la Regulación de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”

Material

Para la prueba de conducta sexual

Redondel de acrílico (60 cm de diámetro x 40 cm de alto).

Con cama base de acerrin.

Jeringas 1ml.

Focos luz roja (40W).

Para la prueba del Laberinto Elevado en Cruz (LEC)

Laberinto Elevado en Cruz el cual consta de 2 brazos abiertos (BA); 50 x 10 cm cada uno y dos con las mismas dimensiones pero con paredes de 40 cm de alto denominados, brazos cerrados (BC), los cuatro brazos se encuentran conectados por un cuadro central de 10 x 10 cm, el LEC se encuentra elevado 50 cm del piso.

Para la prueba de crisis convulsivas

Redondel de acrílico (para evaluación de susceptibilidad de la crisis, 60 cm de diámetro x 40 cm de alto).

Jeringa 1ml.

Registro EEG

Electrodos epidurales (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre), conectores, cables de registro (5 terminales faradizadas adaptadas a conexión directa con amplificadores Grass).

Sistema estereotáxico de una torre: Neuroscience Physiology Research Equipment Stoelting modelo Lab. Standard.

Amplificadores modelo P511 Grass Co.

Computadora tipo PC (HP)

Software de adquisición de señal Poliview 8 (National Instruments).

Análisis estadístico

Prueba t de Student para grupos independientes, valor de $p \leq 0.05$.

Prueba t de Student para grupos dependientes, valor de $p \leq 0.05$.

Prueba U de Mann Whitney, valor de $p \leq 0.05$.

Software para análisis y graficas Sigma Plot.

Software para análisis matemático Origin 8.

Software para análisis estadístico GraphPad.

Cámara de video Sony *HandycamMod* DCR SX40) adaptada a una tarjeta digital de PC para almacenar los videos en una computadora PC (HP/compa 6000; software ENLTV).

Sustancias

Antibiótico (bencilpenicilina Benzatinica, antibióticos de México, S.A. de C.V).

Antiséptico (Microcyn, Oculus Technologies de México).

Lidocaína con epinefrina (265 Laboratorios PiSA de México).

Pentobarbital sódico (Sedalphorte, Salud y Bienestar Animal de México).

Resina Acrílica (Nic Tone Cross Linked, mdc dental México).

Pentilenetetrazol (Sigma-Aldrich, St Lois, MO, U.S.A).

Diazepam (Sigma-Aldrich, St Lois, MO, U.S.A.).

17- β Estradiol (Sigma-Aldrich, St Lois, MO U.S.A).

Progesterona (Sigma-Aldrich, St Lois, MO U.S.A).

Método

Para este proyecto se realizaron 4 técnicas distintas pero complementarias entre ellas: 1) cuantificación de la conducta sexual; 2) cuantificación de la ansiedad en el LEC; 3) medición de los cambios en la latencia de crisis epilépticas por pentilene-tetrazol (PTZ) y 4) registro de la actividad EEG.

Para la realización del trabajo utilizamos 24 ratas macho y 52 ratas hembra de la cepa Wistar (250-350g) provenientes del bioterio del INPRF y del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM; las cuales fueron mantenidas en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25° C), alimento *ad libitum*, bajo un ciclo de luz oscuridad invertido (12 x 12 h; el cambio de horario se realizó de las 22:00 a las 10:00 h) y de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Academia Nacional de Medicina (1999).

Los 76 animales fueron sometidos a las 4 técnicas desarrolladas en esta tesis y se dividieron para el diseño experimental de la siguiente forma: 30 para grupo control (tratamiento con salina) y 46 animales para el grupo experimental (tratamiento con Dz por 10 días) de la siguiente manera:

GRUPOS CONTROL

1. Para caracterizar la conducta sexual en la rata hembra ovariectomizada (Ovx) sin abstinencia, se utilizaron 14 ratas hembras Ovx a las que se les administró durante 10 días solución salina (dosis diaria 1ml i.p.; 16:00h), 17 β -estradiol (dosis única 10 μ m; 48h antes de la prueba de conducta sexual) y progesterona (dosis única 30 μ m; 4h antes de la prueba de conducta sexual; cuadro 1).
2. Para cuantificar la conducta sexual en hembras Ovx sin abstinencia y sin aplicación de hormonas exógenas, utilizamos 5 ratas hembras a las que únicamente se les administró durante 10 días solución salina (dosis diaria 1ml i.p.; 16:00h; cuadro 1).

3. Para estudiar la conducta sexual en machos sin abstinencia se utilizaron 11 ratas machos intactos a los que se les administró durante 10 días solución salina (dosis diaria 1ml i.p.; 16:00h; cuadro 1).

GRUPOS SAD

4. Para caracterizar la abstinencia a Dz en hembras, se utilizaron 5 ratas hembras Ovx a las que se les administró Dz (7mg/Kg, dosis diaria i.p.; durante 10 días). Estudios previos (Mele, 1984) a este proyecto han identificado que 48h después de la última aplicación de Dz la abstinencia es mayor, motivo por el cual todas las mediciones conductuales (sexual y perfil de ansiedad) se realizaron ese día (cuadro 1).
5. Para cuantificar la abstinencia a Dz y su impacto en la conducta sexual en hembras Ovx se realizó un grupo el cual fue tratado con hormonas sexuales (E + P). Se utilizaron 18 ratas hembras Ovx a las que se les administró Dz (7mg/Kg, dosis diaria i.p.; durante 10 días); la evaluación de la conducta sexual se realizó a las 48h después de la última aplicación de Dz. Aplicación de 17 β -estradiol (dosis única, 10 μ m; 48h antes de la prueba de conducta sexual) y progesterona (dosis única, 30 μ m; 4h antes de la prueba de conducta sexual; cuadro 1).
6. Para estudiar en el SAD la conducta sexual inducida solo por E se utilizaron 5 ratas hembras Ovx a las que se les administró durante 10 días Dz (7mg/Kg, dosis diaria i.p.), la evaluación de la conducta sexual se llevó a cabo 48 h después de la última aplicación de Dz administrando solamente 17 β -estradiol (dosis única, 10 μ m; 48h antes de la prueba de conducta sexual; cuadro 1).
7. Para evaluar la conducta sexual en el SAD inducida sólo por P se utilizaron 5 ratas hembras Ovx a las que se les administró 10 días Dz (7mg/Kg, dosis diaria i.p.; durante 10 días) y la evaluación de la conducta sexual se realizó

48 h después de la última aplicación de Dz administrando solamente progesterona (dosis única, 30 μ m; 4h antes de la prueba de conducta sexual; cuadro 1).

8. Para caracterizar la abstinencia a Dz en machos, realizamos un grupo en el que se utilizaron 13 ratas macho intactos a las que se les administró Dz (7mg/Kg, dosis diaria i.p.; durante 10 días). En forma semejante a los grupos de las hembras, la evaluación de la conducta se llevará a cabo al segundo día del SAD (cuadro 1).

Para cuantificar la actividad del SAD en el EEG asociado a los cambios en la conducta sexual y perfil ansiogénico en machos y hembras Ovx realizamos, la secuencia de los grupos experimentales de machos (grupo 8) y el de las hembras Ovx (Ovx+E/P; grupo 5) fueron a su vez divididos en 2 subgrupos:

Ratas (machos N=8; hembras Ovx N=7; cuadro 1) fueron operadas para implantar electrodos epidurales para la obtención de EEG: se registró la actividad eléctrica de la corteza cerebral antes, durante y después del tratamiento de la aplicación de Dz (7mg/Kg; i.p.; 10 días). Estos mismos animales operados (con conector y electrodos crónicos), también se sometieron a la cuantificación del perfil ansiogénico valorado por el LEC (48h después de la última aplicación de Dz), asimismo, la evaluación de la conducta sexual se realizó ese día. La justificación de realizar este sub-grupo de trabajo se basó en lo siguiente: los animales descritos previamente en los que se indujo un SAD, no tienen un correlato electrofisiológico de la actividad EEG con los cambios conductuales: sexuales y de ansiedad durante la abstinencia a Dz. Por esta razón, este grupo resulta imprescindible porque otorgará información de los cambios electrofisiológicos que suceden durante la aplicación de la Benzodiacepina y las modificaciones electrofisiológicas que caracterizan a la abstinencia. Contrastando los registros EEG y su impacto en la conducta. Cabe hacer mención que se analizó: la

actividad EEG control (potencia y amplitud), durante la administración del fármaco y durante la abstinencia (cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental

RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LOS GRUPOS DE TRABAJO

Grupo	n	Sexo	Castración	Diazepam (7mg/Kg,10d)	Estradiol (10µm)	Progesterona (30µm)	PRUEBAS			
							Cond. Sex.	LEC	PTZ	EEG
Ctrl1	14	♀	X		X	X	X	X		
Ctrl2	5	♀	X				X	X	X	
Ctrl3	11	♂					X	X	X	
Exp4	5	♀	X	X			X	X	X	
Exp5	18	♀	X	X	X	X	X	X	X	
Exp6	5	♀	X	X	X		X	X	X	
Exp7	5	♀	X	X		X	X	X		
Exp8	13	♂		X			X	X	X	
Exp9	7	♀	X	X	X	X	X	X	X	
Exp10	8	♂		X			X	X	X	

Cuadro 1. Los experimentos de conducta sexual, LEC y PTZ se realizaron de manera consecutiva, sin contrabalanceo y en un horario de 18:00, los registros EEG fueron tomados antes (30 minutos previos), durante (días 1 y 5) y después del tratamiento a Dz (5 días de seguimiento), en un horario entre las 15:00 y 20:00. Los grupos 9 y 10 corresponden a los subgrupos de hembras Ovx (grupo 5) y machos intactos (grupo 8) respectivamente.

V.I Cirugía Ovariectomía (Ov)

Con el propósito de eliminar la síntesis de hormonas esteroides (E y P) en las ratas hembra y sincronizar las fases del ciclo estral por tratamiento hormonal, los animales fueron sometidos a cirugía de Ov bilateral. Ratas hembra Wistar de 250 a 350 g., fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (33 mg/Kg de peso; i.p., Anestosal®). Bajo anestesia profunda, al animal en decúbito, se efectuó limpieza intensa abdominal con isodine y en condiciones de antisepsia se le realizaron 2 incisiones menores de 0.6 cm en la porción inferior del abdomen, en

ambos flancos. Con una pinza de disección en dirección oblicua y medial a la cavidad abdominal se tomaron las tubas uterinas, se siguieron en dirección anatómica para extraer a ambos ovarios, cuya morfología conocida en la porción terminal fueron anudados con hilo de seda 000 para eliminar la circulación sanguínea, a continuación se cortaron con tijeras mayo quirúrgicas ambos ovarios y cada muñón fue limpiado, corroborando la ausencia de hemorragia, las tubas uterinas fueron regresadas a la cavidad abdominal. Cerrando todos los planos con seda. Para evitar infecciones aplicamos en forma profiláctica dosis única de penicilina benzatínica 1000000 UI; IM. Todos los animales tuvieron una recuperación de 14 días antes de cualquier manipulación

V.II Hormona-priming

Con el objetivo de inducir el estado de estro (fase receptiva de la hembra en la rata) en la rata ovariectomizada, se administró dosis única subcutánea de 17β -estradiol ($10\mu\text{g}$) 48h antes de realizar la valoración de la conducta sexual. Asimismo, se administró también dosis única subcutánea de progesterona ($30\mu\text{g}$) 4 h previas a la evaluación de la conducta sexual.

V.III Prueba de conducta sexual en la rata hembra

Las ratas hembra Ovx previamente tratadas con hormonas y bajo las condiciones experimentales propuestas con anterioridad, se colocaron en un redondel (60 cm diámetro x 40 cm de altura; con piso de aserrín limpio), en condiciones de luz roja (40 W), la prueba se realizó siempre en el horario de las 18:00 h; con disminución de ruido externo. En presencia de un macho sexualmente experto, las ratas hembras iniciaron un proceso de actividad proceptiva, este evento se acompañó de lordosis, lo cual indicó que el proceso de conducta sexual fue exitoso. Esta conducta fue necesaria para el proceso final del apareamiento en roedores. El tiempo de evaluación fue de 10 min ó 10 lordosis (lo que ocurra primero). De esta manera, para la conducta sexual de la rata hembra se cuantificó: 1) el número de lordosis así como 2) el cociente de lordosis (número de lordosis/número de montas). La medición de la conducta sexual se realizó en

una sola ocasión: al día 2 de la abstinencia a Dz ó 48h después de la última aplicación de los fármacos. Cada prueba de conducta sexual se grabó en video (Sony *handicam Mod DCR SX40*) adaptada a una tarjeta digital de PC para almacenar los videos en una computadora PC (HP/compaq 6000; software ENLTV).

V.IV Prueba de conducta sexual en la rata macho

Se utilizaron ratas machos sexualmente activas entrenadas previamente durante 14 días, (para que estos animales fueran sexualmente competitivos y exitosos en la ejecución de la conducta). El entrenamiento consistió en que los animales fueron expuestos cada 2 días a ratas hembras en fase de estro. Los machos gradualmente adquirieron el aprendizaje de la conducta copuladora. Los machos clasificados como sexualmente activos fueron aquellos que realizaron series eyaculatorias con promedio de 12 a 14 montas, las cuales culminaron con eyaculaciones. En el proceso de adquisición de la conducta, si este evento de series de montas/eyaculaciones fue exitoso, en 5 de 7 sesiones el animal fue considerado apto para la prueba. Estos animales se colocaron en el redondel (60 cm diámetro x 40 cm de altura; con piso de aserrín limpio), en condiciones de luz roja (40 W).

En presencia de una hembra proceptiva/receptiva, el macho sexualmente activo, inició un proceso de actividad sexual (realizó montas, intromisiones y eyaculaciones). Durante 10 minutos fue el tiempo de evaluación o cuando se completó la serie eyaculatoria (lo que ocurriera primero). De esta manera, para la conducta sexual de la rata macho se cuantificó: 1) el número de montas; 2) número de intromisiones. La medición de la conducta sexual en el macho se realizó también en una sola ocasión: al día 2 de la abstinencia a Dz ó 48h después de la última aplicación de los fármacos (Lucio, 2008).

V.V Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC) para determinar ansiedad.

El segundo día de abstinencia (48h después de la última aplicación de salina o Dz) se evaluó la conducta de ansiedad en el LEC. El LEC es una prueba

utilizada ampliamente para medir ansiedad y efectos ansiolíticos provocados por fármacos (Rodgers y Dalvi, 1997). La valoración más importante de esta prueba es que si una rata presenta ansiedad, entra más veces a los brazos cerrados (la rata ha cruzado las cuatro patas hacia el interior de los mismos), así como un mayor tiempo de permanencia en la porción del laberinto que tiene paredes (BC).

El LEC se realizó en una habitación iluminada con luz roja de 40 watts, para ratas que recibieron tratamiento con salina (N=30) y para el grupo que recibió el tratamiento crónico de Dz (N=46); el animal fue sometido a la prueba una sola vez por 10 min para evitar el proceso de habituación y/o de aprendizaje de la tarea (Anaya, 2008). La ejecución de la prueba consistió en colocar al animal en el punto central del LEC mirando hacia uno de los BA. Luego del tiempo de observación directa se evaluó: a) el número de ingresos a los BA y BC, y b) el tiempo de permanencia en ellos (min). Cada prueba del LEC se grabó en video.

Fig. 10 Laberinto Elevado en Cruz (LEC)

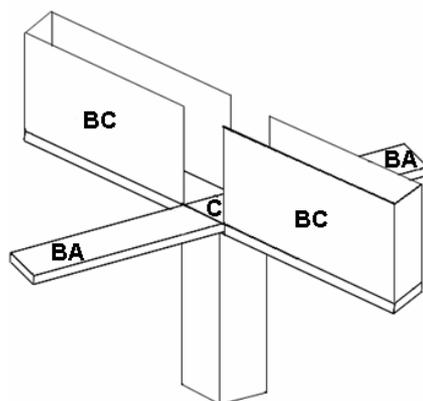


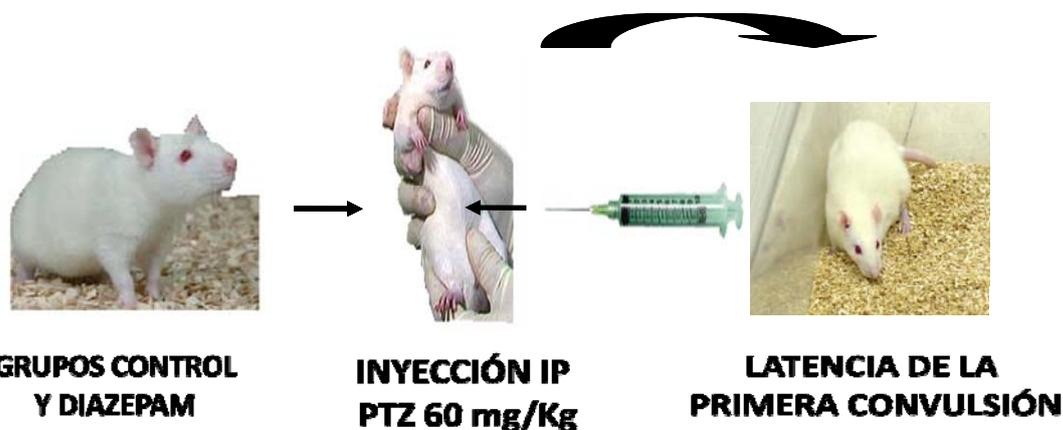
Figura tridimensional de un laberinto elevado en cruz (LEC). (BA) Representan los brazos abiertos, cuyas dimensiones son 50 x 10 cm cada uno. (BC) son los brazos cerrados que tienen paredes elevadas a 40 cm, con las mismas dimensiones que BA, (C) cuadro central de 10 x 10 cm que une a los cuatro brazos, el LEC se encuentra a 50 cm del piso (tomado de Anaya, 2008).

V.VI Estudio de los cambios en la excitabilidad neuronal de la abstinencia por el SAD: valoración en la inducción de crisis convulsivas por PTZ.

Debido a la premisa de que la abstinencia incrementa la excitabilidad neuronal cortical, una evaluación control adicional que se realizó en esta tesis es la inducción de crisis convulsivas tónico-clónicas ante la aplicación i.p. de PTZ (un bloqueador de la actividad GABAérgica) en animales sin y con SAD. Estudios previos indican que la dosis efectiva de PTZ para realizar este proceso inductor de epilepsia es de 60 mg/Kg. Si esta premisa es correcta, la latencia de inducción de crisis epilépticas debe ser menor en los animales con un SAD con respecto a los animales control. De esta manera evaluamos el efecto del SAD en la inducción de crisis convulsivas y comparando machos y hembras con SAD contrastando con los animales del grupo control (Fig. 11).

Los animales que recibieron el tratamiento crónico de Dz (7mg/Kg; i.p., por 10 días; machos N=5 y hembras Ovx, N=26) como los de los grupos control que sólo recibieron vehículo (solución NaCl al 0.9%; machos, N=11 y hembras Ovx N=19, 1ml, i.p., dosis diaria durante 10 días) se les cuantificó la conducta sexual y la ansiedad en el LEC a las 48h después de la última aplicación de Dz. Todos los animales, el día 2 de la abstinencia a DZ recibieron una dosis de 60 mg/Kg i.p. de PTZ. El animal fue observado en una cámara de registro y se midió el tiempo (en segundos) de aparición de la primera sacudida tónico-clónica.

Figura 11



Administración i.p. de PTZ en la rata para inducir crisis convulsivas. En esta prueba se cuantificó la latencia de aparición de la primera crisis convulsiva después de inyectar PTZ.

Dosis de PTZ 60 mg/Kg

Control (salina)	Abstinencia a Dz (día 2)
(Machos N=11)	(Machos N=5)
Hembras N=19)	Hembras N= 26)

V.VII Cirugía Estereotáxica

A un subgrupo de animales se les realizó una cirugía estereotáxica colocando electrodos para registro crónico de EEG (Fig. 12 A; cuadro 1).

La cirugía se llevó a cabo en animales anestesiados con pentobarbital sódico (33 mg/Kg de peso; i.p., Anestosal®). Se realizó en condiciones de asepsia, una incisión medial de 2 cm del cuero cabelludo. Al animal se le hicieron medidas de hemostasia efectiva para evitar sangrados y riesgo de infecciones. Se rompió la galéa aponeurótica para que el hueso quede en condiciones de ser perforado y colocar de forma bilateral electrodos de acero epidurales, coordenadas: 2mm posteriores bregma, 2 mm anteriores a bregma y 2 mm laterales a la línea media del cráneo (mediante un sistema estereotáxico, ASI Instruments; para registro EEG de la corteza frontal [CxF] y somato motora [CxP]); las terminales de cobre de cada electrodo se soldaron a un conector de 6 pines, el complejo electrodos-conector se fijó al cráneo con cemento acrílico (Fig. 12B).

Aplicamos en forma profiláctica 100000 UI; de penicilina benzatínica IM dosis única. Después de una semana de recuperación quirúrgica, se llevó a cabo la habituación de los animales a las condiciones de la caja de registro. A partir de este tiempo, cada 24 h se registró el EEG antes, durante y después del tratamiento con Dz. Todos los registros del electroencefalograma fueron tomados entre las 15:00 y las 20:00 horas, durante la fase oscura del ciclo luz-oscuridad de la rata.

Figura 12

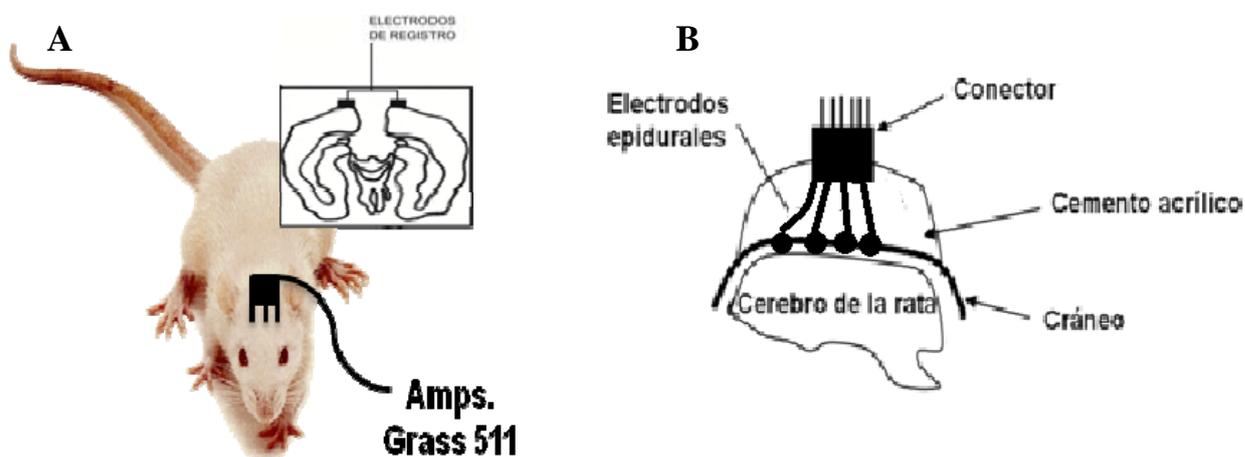


Diagrama de la colocación de los electrodos epidurales en la rata. A) Imagen de una rata, en la que se observa el lugar de colocación del complejo de electrodos. B) Esquema sagital que muestra el circuito de conexión entre los electrodos y el conector.

V.VIII Logística de la obtención del EEG

El objetivo de estos subgrupos experimentales fue obtener un registro EEG de animales durante el desarrollo del SAD, es decir, cuantificar la hiperexcitabilidad neuronal cortical por la abstinencia a Dz. Las ratas que fueron sometidas a la cirugía estereotáxica para implantarles los electrodos de registro (machos, N=8; hembras, N=7) recibieron el tratamiento previamente descrito de inducción de SAD: aplicación i.p. de Dz, durante 10 días (7mg/Kg). Se registró a las ratas que se encontraban en libre movimiento durante 30 min en condiciones previas al tratamiento y los días 1 y 5 del tratamiento con la Bz, con el propósito de

analizar los cambios en el EEG por la administración de Dz. Al concluir el tratamiento de Dz, las ratas se registraron diariamente por 120 min para cuantificar la actividad cortical de la abstinencia los siguientes 5 días después de la interrupción del tratamiento.

Cada registro EEG se obtuvo mediante 2 amplificadores Grass modelo P511; la digitalización y adquisición de la señal se realizó a una velocidad de muestreo de 1000 Hz, la banda de frecuencia entre 3 y 300 Hz. Cada registro se archivó individualmente para su análisis subsiguiente con el software PolyView16 en una computadora PC con tarjeta analógica digital de *National Instruments Co.* La señal EEG digitalizada fue analizada para obtener: 1) conteo de espigas epilépticas (ondas de alta frecuencia y amplitud que caracterizan a la abstinencia del Dz) así como 2) el espectro de potencia del EEG comparándolo desde el día control, los días 1, 5 de tratamiento y los 5 días del SAD.

Análisis estadísticos

La significancia de las diferencias de los grupos tratados con respecto a los grupos controles se estimaron en todos los casos, primero haciendo un análisis de Varianza de grupos (ANOVA) y posteriormente aplicando la prueba estadística apropiada para cada caso en particular.

La conducta sexual para las hembras fue evaluada a partir del promedio de número de lordosis y cociente de lordosis. Para los machos a través del promedio de número de montas y número de intromisiones. Se realizó la prueba de ***U de Mann Whitney***, con valoración de 2 colas tomando como valor mínimo de significancia de **$p \leq 0.05$** .

Para el LEC valoramos el promedio del número de entradas a BA y BC, así como el porcentaje de tiempo de permanencia a cada uno de ellos. Con la prueba de ***t de student para grupos dependientes***, con valoración de 2 colas tomando como valor mínimo de significancia de **$p \leq 0.05$** .

Para valorar la hiperexcitabilidad neuronal del SAD el promedio de la latencia de la primer crisis convulsiva inducida por PTZ. Se realizó la prueba de ***U***

de Mann Whitney, con valoración de 2 colas tomando como valor mínimo de significancia de $p \leq 0.05$.

Por otro lado, la evaluación del conteo del número de espigas en el EEG en el SAD así como su espectro de potencia, fueron evaluados a partir del mismo sujeto de experimentación, por lo que utilizamos una prueba pareada con una población con distribución normal. Con la prueba de **t de student para grupos dependientes**, con valoración de 2 colas tomando como valor mínimo de significancia de $p \leq 0.05$. Para comparar las diferencias entre grupos independientes con la misma variable realizamos una prueba **U de Mann Whitney**.

Todos los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad de InStat versión 3.5.

VI. RESULTADOS

VI.I Efecto de la abstinencia a Diazepam en la conducta sexual de la rata hembra.

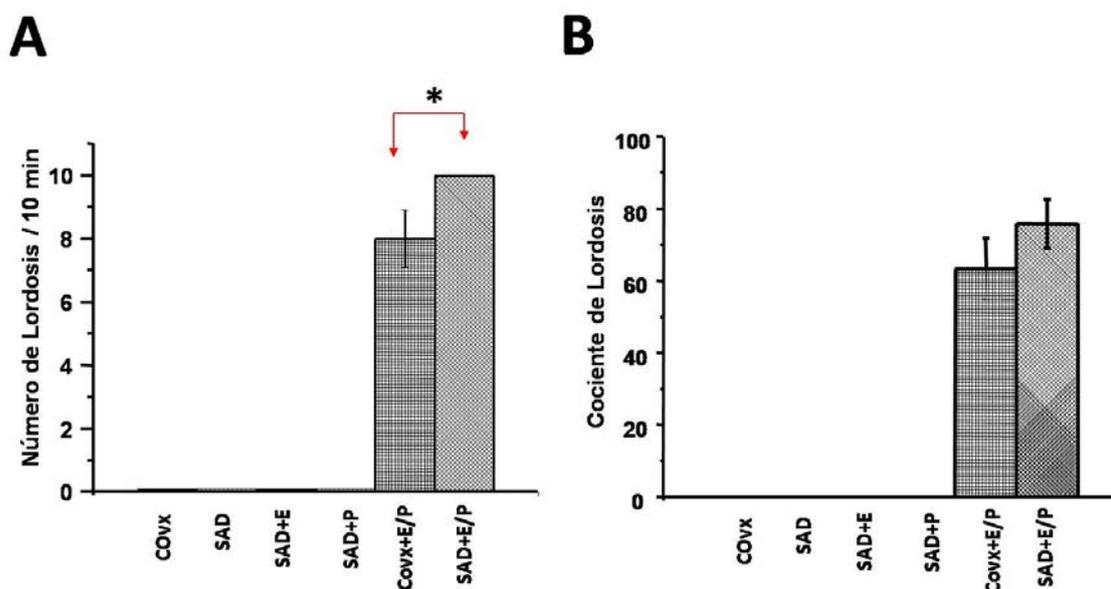


Figura 13. A) Número de lordosis promedio \pm EE, realizadas durante la prueba en presencia de un macho sexualmente activo durante 10 minutos, el grupo SAD+E/P no presenta dispersión debido a que realizó el mayor número de lordosis posibles antes de que terminara el tiempo de evaluación. La significancia estadística fue validada por la prueba de U-Mann Withney. B) Promedio del Cociente de lordosis (número de lordosis/número de montas \times 100) \pm EE. **COVx**, hembra control ovariectomizada (N=5); **SAD**, hembra con Síndrome de Abstinencia a Diazepam (N=5); **SAD+E**, hembra con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E (N=5); **SAD+P**, hembra con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+P (N=5), **Covx+E/P**, hembra control+E/P; **SAD+E/P**, hembra con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E/P (N=18), * $p \leq 0.04$.

Debido a que la premisa inicial de esta tesis plantea que durante el SAD existe una disminución en la actividad GABAérgica del cerebro y este estado de hiperexcitabilidad neuronal puede incrementar la conducta sexual de la rata hembra, el primer grupo de trabajo que se realizó en esta tesis, fue para cuantificar el número de lordosis así como el cociente de lordosis de las ratas hembras Ovx en condiciones control. Para valorar el impacto que tiene el SAD (grupo SAD+E/P) sobre la conducta sexual en la rata hembra Ovx. Ésta evaluación se realizará durante el segundo día del SAD que es el tiempo en el cual se observan los cambios conductuales y electrofisiológicos significativos en las abstinencias a fármacos GABAérgicos.

Las ratas hembras COVx (N=5) no despliegan lordosis durante el proceso de apareamiento, es decir la presencia de una rata macho sexualmente experta no

condiciona a la hembra Ovx para la conducta sexual. Ratas Ovx a las que se les indujo el SAD (N=5) tampoco mostraron inducción de la lordosis (Fig. 13A) y el cociente de lordosis fue igual a cero en estos grupos de animales (Fig. 13B).

La aplicación de estrógenos (E) o progesterona (E) en animales control y con SAD, no inducen lordosis en las ratas hembras. Aplicar E a animales con SAD (N=5) no hace receptiva a la rata, asimismo, otro grupo de animales con SAD (N=5) a los que se les aplicó P, tampoco despliegan la conducta sexual de lordosis. Sin embargo, la aplicación secuenciada de E y P a ratas Ovx (COvx+E/P N=14) permite la inducción de la conducta sexual (número de lordosis en 10 min). Estas ratas tuvieron en promedio 8 ± 0.9 lordosis y un cociente de lordosis de 63 ± 8 % (Fig. 13B). Es de hacerse notar que el grupo de ratas hembras Ovx con SAD, el mismo tratamiento secuencial de esteroides (SAD+E/P; N=10) incrementa significativamente el número de lordosis: 9 ± 0.000001 ($p \leq 0.04$; Fig. 13A) y también el cociente de lordosis (75 ± 6 %; Fig. 13B).

Estos datos indican dos aspectos fundamentales: 1) que la conducta sexual en la rata hembra depende de la aplicación secuencial de E y P y 2) que la abstinencia a Diazepam incrementa esta conducta en las hembras Ovx. Si bien el primer punto ya se conoce, el segundo es una evidencia nueva: el SAD es capaz de incrementar la receptividad sexual de la rata hembra.

VI.II Efecto de la abstinencia a Diazepam en la conducta sexual de la rata macho.

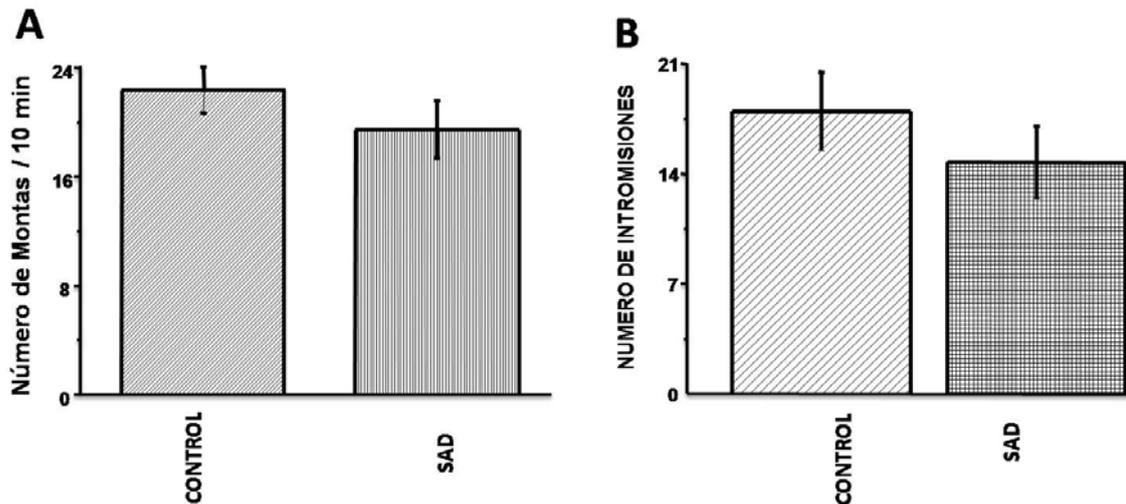


Figura 14. A) Número promedio de montas \pm EE de dos grupo de ratas macho intactos (Control N=6; comparados con Abstinencia a Dz N=5) realizadas en presencia de una rata hembra Ovx con tratamiento secuenciado de E/P durante 10 min o una serie eyaculatoria. B) promedio del número de intromisiones de ambos grupos. **CONTROL**, machos intactos control; **SAD**, machos con Síndrome de abstinencia a Diazepam; ambas pruebas no muestran diferencias significativas; $p \leq 0.05$.

Trabajos previos muestran que la conducta sexual de las ratas macho no se comportan de la misma forma a esteroides sexuales (administración secuenciada de E y P) valorados en las ratas hembras Ovx. Las ratas macho en la conducta sexual muestran un proceso de aprendizaje que desde el punto de vista técnico es más elaborado. Los machos sexualmente activos tienen que entrenarse durante 15 días en sesiones de 60 min cada dos días con hembras sexualmente maduras y con actividad lordótica manifiesta. La evaluación durante el segundo día de la abstinencia a Diazepam de la conducta sexual de la rata macho fue: 1) el número de intromisiones (penetraciones en la vagina) así como 2) el número de montas de la rata macho sobre la hembra en un periodo de 10 min o en su defecto, que el animal realizara una serie eyaculatoria completa, mostró los siguientes resultados.

El número promedio de montas de las ratas macho del grupo control (N=11) fue de 22 ± 1 ; en tanto que el número de intromisiones de este grupo fue de 18 ± 2 (Fig.14). A diferencias de lo valorado en las ratas hembras Ovx en las que el SAD incrementa la conducta sexual, la abstinencia a Diazepam no tiene impacto en la

conducta sexual de la rata macho. El número de montas en animales con un SAD (N=13) fue de 19 ± 2 y el número de intromisiones fue de 14 ± 2 . Es decir, que aunque la tendencia es una disminución en la conducta sexual de la rata macho por el SAD, estas diferencias no fueron significativas.

VI.III Perfil ansiogénico en el segundo día de abstinencia a Diazepam de la rata hembra.

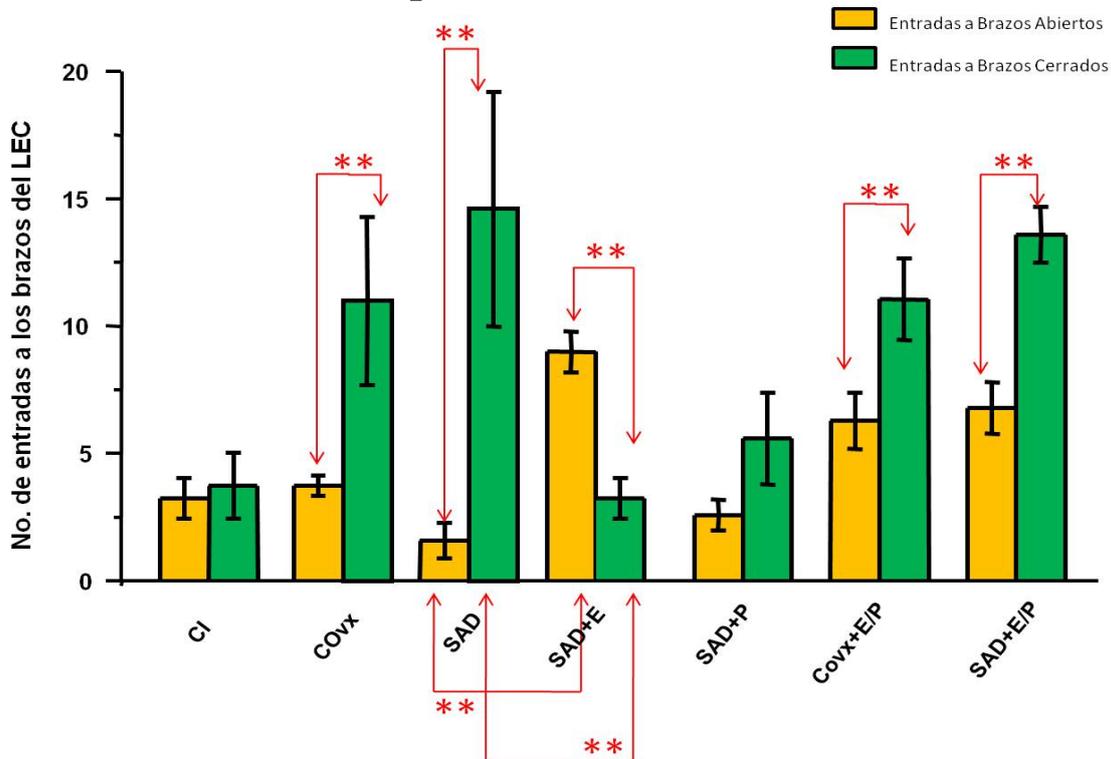


Figura 15. La prueba del Laberinto Elevado en Cruz (LEC) indica que un animal que permanece más tiempo en los brazos cerrados (verde) con respecto a los brazos abiertos (amarillo), es un animal que manifiesta ansiedad. Los datos muestran la generación de ansiedad en todos los grupos, tanto control como con SAD, excepto en los grupos que recibieron por separado E o P. Se graficó el promedio de entrada a los BA y BC \pm EE. La validación estadística se realizó por medio de una prueba *t de student para grupos dependientes*. **CI**, hembra intacta (N=5); **COVx**, hembra control Ovx (N=5); **SAD**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam (N=5); **SAD+E**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E (N=5); **SAD+P**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+P(N=5), **COVx+E/P**, hembra Ovx+E/P (N=14); **SAD+E/P**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E/P (N=18), *df*=4; **p*≤0.04, ***p*≤0.002.

En este trabajo utilizamos el LEC para estudiar la conducta de ansiedad de los animales en los primeros estadios del SAD. En el caso de los grupos de las ratas hembras Ovx, tanto control (COvx) o que tengan un SAD, existe una preferencia de entradas a los brazos cerrados (BC) y poca exploración en los brazos abiertos (BA). Es decir, que si los roedores prefieren la entrada a los BC es debido a que se ocultan, lo cual se interpreta como ansiedad. Los resultados muestran que las ratas control (COvx; N=5) tienen un mayor número de entradas a BC: 11 ± 2 con respecto a las entradas a BA: 3 ± 0.3 (Fig. 15, $p \leq 0.01$), señala que este grupo de animales control ya presenta un grado basal de ansiedad. El grupo de animales hembras Ovx con un SAD (N=5) mostró un mayor número de entradas a BC: 14 ± 4 , sin embargo, éste promedio no fue significativo con respecto del grupo control, por lo que puede inferirse que los animales con SAD y los controles Ovx muestran un alto perfil de ansiedad ($p \leq 0.0004$).

Cuando utilizamos ratas hembra Ovx para estandarizar la inducción de la conducta sexual por la administración secuenciada de E/P, los resultados de la medición de la conducta de ansiedad de estos animales revelaron altos niveles de ansiedad. Este hecho motivó la búsqueda de los aspectos que pudieran influir en la aparición de la ansiedad: 1) la cirugía para ovariectomizar, 2) el efecto postquirúrgico de la castración de los animales y 3) la eliminación parcial o casi total de la síntesis de hormonas sexuales por estos animales. Con este fin en un grupo de ratas no Ovx realizamos la misma prueba de medición de ansiedad. En ratas intactas (CI; N=5) el número de entradas a BA fue de 3 ± 0.8 , en tanto que la entrada a BC fue de 3 ± 1 , lo cual indicó que estos animales no presentan un perfil de ansiedad, lo que explica parcialmente porque las ratas que fueron Ovx presentan un estado de ansiedad basal. Los argumentos de discusión se hacen más adelante.

Para distinguir si la aplicación de los esteroides sexuales (E o P) por separado y en secuencia puede modificar la ansiedad, realizamos los siguientes grupos. La administración de Estradiol a ratas hembras Ovx con SAD (grupo SAD+E; N=5). En éste grupo se reduce la ansiedad en forma significativa ($p \leq 0.02$); la entrada a BC se reduce a 4 ± 0.8 ; en tanto que la entrada a BA fue de

9±0.8 (Fig. 15). En forma semejante la aplicación de progesterona a animales también con SAD (grupo SAD+P; N=5) produjo una reducción en el perfil de ansiedad; en este grupo la entrada a BA y BC no presenta diferencias significativas (Fig. 15).

Por otra parte, el grupo de ratas hembras Ovx que recibió la aplicación secuenciada de E/P (COvx+E/P; N=14) manifestó un perfil de ansiedad, aumentando el número de entradas a BC, 11±1; el cual es diferente estadísticamente al número de entradas a BA, 6±1 ($p \leq 0.002$, Fig. 15). Finalmente las ratas hembras Ovx con un SAD que recibieron la secuencias E/P (grupo SAD +E/P; N=18), también presentó un incremento en la ansiedad de estos animales, ya que entran mayoritariamente a los BC, 13±1 con respecto a los BA, 6±1 (Fig. 15; $p \leq 0.0002$).

VI.IV Porcentaje del tiempo de permanencia a los brazos del LEC de las ratas hembras.

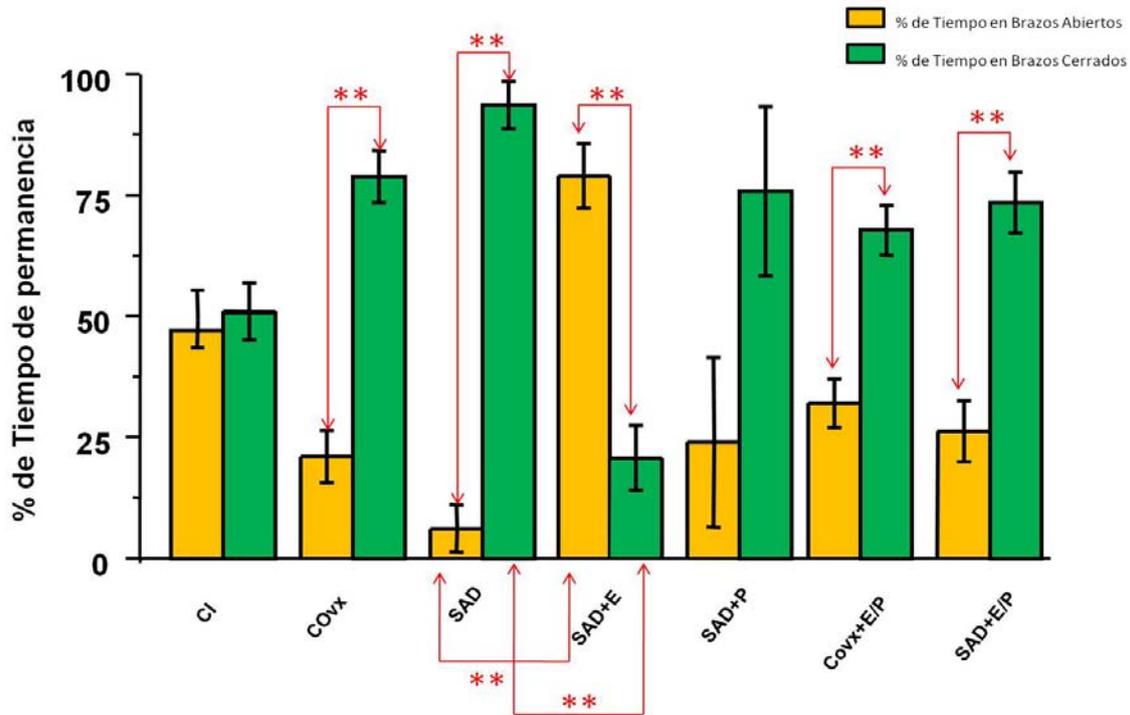


Figura 16. Ejecución en el LEC a través de una variable de gran validez: porcentaje del tiempo de permanencia: los animales con ansiedad prefieren estar más tiempo en los brazos del laberinto resguardados BC (barras verdes) con respecto a los BA (barras amarillas), excepto en los grupos que recibieron por separado E o P. Se graficó el porcentaje del tiempo de permanencia en los BA y BC \pm ES. La validación estadística se realizó por medio de una prueba *t de student para grupos dependientes*. **CI**, hembra intacta (N=5); **COvx**, hembra control Ovx (N=5); **SAD**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam (N=5); **SAD+E**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E (N=5); **SAD+P**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+P (N=5), **COvx+E/P**, hembra Ovx+ E/P (N=14); **SAD+E/P**, hembra Ovx con SAD+E/P (N=18), $df=4$; $**p \leq 0.0003$.

Uno de los datos cuantitativos que tiene el LEC para estandarizar en roedores el proceso de medición de la ansiedad, lo cual valida esta prueba y justifica su utilidad en la presente tesis, es el porcentaje del tiempo de permanencia en cualquiera de los brazos, BC y BA. En la ejecución en el LEC además de haberse cuantificado las entradas, la permanencia en el brazo elegido por las ratas permite evaluar con mejor detalle a la ansiedad.

El porcentaje de tiempo de permanencia del animal en BA o BC (Fig. 16), está relacionado con el número de entradas que presentaron las ratas hembras en el perfil ansiogénico (Fig. 15). En el grupo control (COvx N= 5), el grupo SAD (N=

5); así como los grupos que recibieron en forma secuenciada E/P (COvx +E/P; N=14 y SAD+E/P; N=18), el porcentaje de tiempo de permanencia en BC fue mayor a un 65% en todos los casos (Fig. 16), estos valores tienen diferencia significativa con respecto a los valores del porcentaje de su tiempo de permanencia en BA. La validación estadística se realizó por medio de una prueba *t de student para grupos dependientes* ($p \leq 0.005$), indicando que los animales además de entrar de forma más frecuente a BC, su permanencia en estos brazos tiene una relación directa. En contraste el grupo de animales con un SAD que recibieron por separado E (SAD+E, N=5), el porcentaje de su tiempo de permanencia es mayor en los brazos abiertos, es decir, los E funcionan en estos animales como un agente ansiolítico, reduciendo significativamente la permanencia en los BC ($p \leq 0.0003$).

El grupo de animales hembras que no fueron ovariectomizadas (CI; N=5) muestran que el porcentaje de tiempo de permanencia en BA fue de 49 ± 5 y a BC 50 ± 5 . Estos resultados confirman que las hembras sin castración no presentan ansiedad (Fig. 16).

Los resultados de las figuras 15 y 16, muestran el número de entradas a BC o BA y el porcentaje de tiempo de permanencia en BC o BA, respectivamente; indican: 1) que las ratas hembras ovariectomizadas del grupo control y con un SAD presentan un perfil de ansiedad; 2) sin embargo, el nivel basal de ansiedad de estos animales control obedece a que la cirugía Ov modifica los niveles de hormonas sexuales basales y los niveles de E, esto se basa en la evidencia del análisis de los resultados del grupo de animales no Ovx, en los que no muestran ansiedad. 3) La aplicación por separado de E o P, son capaces de reducir la conducta ansiosa en las ratas con SAD. Sin embargo, es necesario señalar que la aplicación en secuencia de los mismos esteroides no reduce la conducta de ansiedad.

VI.V Diferencia del número de entradas en los brazos del LEC entre machos y hembras.

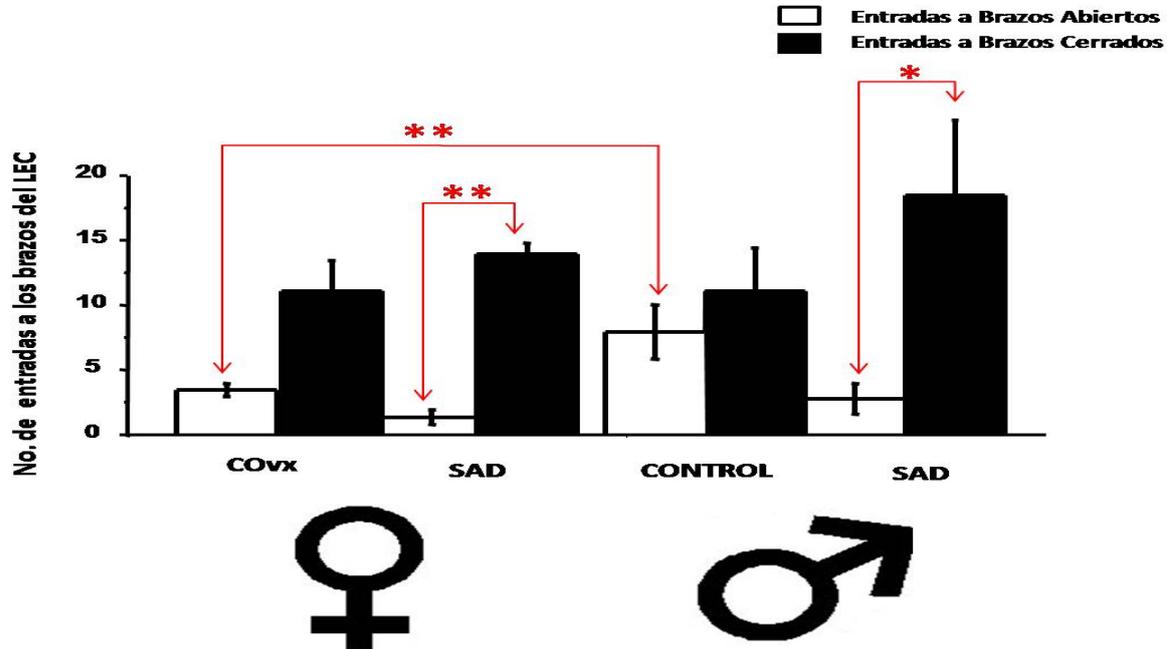


Figura 17. Evaluación de la ansiedad cuantificada en el LEC evaluando el promedio de número de entradas \pm EE a BA (barras blancas) y BC (barras negras) para ratas hembras Ovx y ratas macho. El grupo de ratas macho en condiciones basales (Control) no presenta ansiedad, en contraste el SAD induce la aparición de la conducta ansiosa. Nótese que las hembras Ovx y con un SAD tienen una manifestación de ansiedad semejante a la de los machos con SAD. Se aplicaron dos pruebas de validación estadística, prueba *t de student para grupos dependientes* y prueba *t de student para grupos independientes* **COVx**, hembras Ovx control (N=5); **Control**, machos control (N=11), **SAD**, hembras Ovx (N=5) y machos intactos (N=13) con Síndrome de Abstinencia a Diazepam (SAD), *df*= 4; * $p \leq 0.02$, ** $p \leq 0.005$.

El estudio conductual de la ansiedad en la abstinencia a Dz en etapas tempranas en ratas macho fue cuantificada en dos grupos: control (N= 11) y SAD (N=13), en contraste al grupo de hembras control Ovx, el grupo control de ratas macho no presenta un perfil de ansiedad, es decir que el número de entradas a BA (8 ± 1) con respecto a la entrada a los BC (12 ± 2) no tiene diferencia estadísticamente significativa. Las ratas macho manifestaron un SAD, 3 ± 1 entradas a BA y 18 ± 1 a los BC; diferencia que fue estadísticamente significativa (Fig. 17; $p \leq 0.02$). Estos datos indican, que las ratas macho en condiciones basales no manifiestan ansiedad, sin embargo, durante la abstinencia a Dz el perfil ansiogénico es extraordinariamente marcado en los machos.

Los resultados de la figura 17 muestran diferencias importantes en el perfil de la ansiedad entre los grupos control de la rata hembra Ovx y la rata macho. Es de hacerse notar que en condiciones basales, la entrada a los brazos abiertos por parte de los machos fue de 8 ± 1 ; es mayor a la de las hembras Ovx, 3 ± 0.3 , es decir, exploran más, tienen mayor movilidad y presentan menos miedo que las ratas hembra Ovx ($p \leq 0.005$). Sin embargo, en condiciones de un SAD aparece el perfil de ansiedad semejante para ambos grupos. El SAD de un macho y de una hembra Ovx es semejante en cuanto a su perfil ansiogénico. No hay diferencias significativas entre la ansiedad de una rata macho y de una rata hembra Ovx, ya que las entradas a BC son muy cercanas (18 ± 1 vs 14 ± 4 , respectivamente).

VI.VI Diferencia del porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos del LEC entre machos y hembras

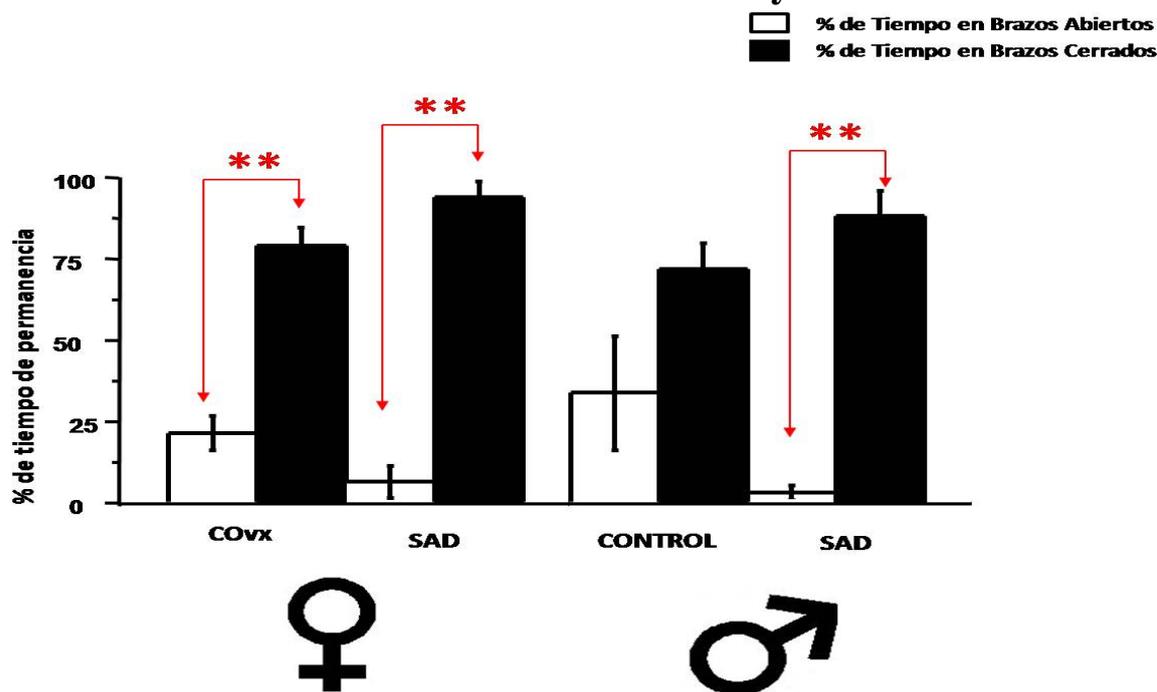


Figura 18. Evaluación de la ansiedad en el LEC determinando el porcentaje de tiempo de permanencia \pm EE a BA (barras blancas) y BC (barras negras) para ratas hembras Ovx y ratas macho. El grupo de ratas macho en condiciones basales (Cont) no presenta ansiedad, en contraste el SAD induce la aparición de la conducta ansiosa. Nótese que las hembras Ovx y con SAD tienen una manifestación de ansiedad semejante a la de los machos con SAD. Se aplicaron dos pruebas de validación estadística *t de student para grupos dependientes* y *t de student para grupos independientes*. **Covx**, hembras Ovx control (N=5); **Control**, machos intactos control (N=11), **SAD**, hembras Ovx (N=5) y machos intactos (N=13) con Síndrome de Abstinencia a Diazepam, $df=8$, $**p \leq 0.0001$.

Para expresar la conducta de ansiedad de manera cuantitativa en forma semejante a la evaluación de las ratas hembras, se midió el porcentaje de tiempo de permanencia en alguno de los dos brazos (BC y BA) del LEC para los grupos de ratas macho.

Este tiempo de permanencia se correlaciona con el número de entradas en el LEC, los machos del grupo control tienen un porcentaje mayor de permanencia en BC ($65\pm 8\%$) con respecto al BA ($34\pm 8\%$). Estos tiempos de permanencia no ofrecen una diferencia significativa, lo que indica que los animales no presentaban ansiedad. En contraste, el grupo de animales con SAD (N=13), el tiempo de permanencia en los BA tiene diferencias significativas con respecto al grupo control, ($3\pm 2\%$; $p\leq 0.03$), así como un incremento significativo ($89\pm 3\%$; $p\leq 0.0001$), en el porcentaje de permanencia en los BC (Fig. 18). Estos datos de tiempos de permanencia presentan semejanzas con la preferencia de los brazos del LEC en los que se mantienen las ratas. De esta manera, el comportamiento durante un SAD en la evaluación de ansiedad en los machos contrasta con su grupo control dando diferencias significativas, es decir, la ansiedad aparece solo durante el SAD, sin embargo, en las hembras Ovx, queda de manifiesto la semejanza en su porcentaje de tiempo de permanencia entre las ratas control Ovx y aquellas Ovx con SAD ($p\leq 0.05$; Fig. 18).

VI.VII Incremento en la susceptibilidad a inducir crisis convulsivas en la rata hembra durante el SAD.

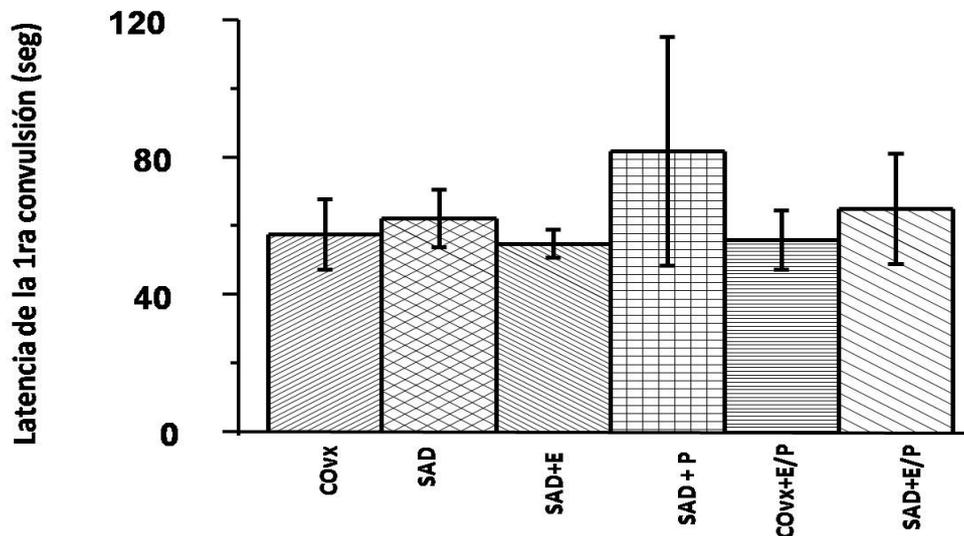


Figura 19. Susceptibilidad de inducción de la primera crisis convulsiva durante el SAD en ratas hembras Ovx. Cuantificamos el promedio de la latencia (seg) \pm EE de aparición de la primer crisis tónico-clónica generada por PTZ (60mg/Kg). El umbral de génesis de crisis convulsivas no se modifica significativamente en las ratas hembras Ovx, aún con la aplicación secuenciada o por separado de estrógenos y progestágenos durante un SAD. Se aplicó la prueba *U de Mann Withney*. **COvx**, hembra control Ovx (N=5); **SAD**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam (N=5); **SAD+E**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E (N=5); **SAD+P**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam + P (N=5), **Covx+E/P**, hembra Ovx+ E/P (N=14); **SAD+E/P**, hembra Ovx con Síndrome de Abstinencia a Diazepam+E/P (N=11), $p \leq 0.05$.

Nuestros resultados muestran que la interrupción abrupta de Dz es suficiente para incidir en la conducta sexual y en la ansiedad en los animales tratados. Estos cambios son posibles de ser inducidos por modificaciones en diversos sistemas de neurotransmisión del SNC, entre ellos el GABAérgico y el glutamatérgico, evidencias recientes indican que la abstinencia a Dz pueda ser la expresión de un incremento en la actividad en los receptores NMDA y una disminución de la sensibilidad de los receptores ionotrópicos GABA_A. En virtud de que en un SAD existe un incremento en la excitabilidad neuronal consecuencia de un desequilibrio farmacológico generada por la Benzodiacepina, dos interrogantes se plantearon: 1) ¿El SAD reduce el umbral de inducción a una crisis epiléptica?, 2) en el caso de hacerlo ¿El impacto del SAD en el umbral de crisis epilépticas es igual en ratas macho que en ratas hembra?

Para resolver estos cuestionamientos, en los siguientes experimentos cuantificamos la latencia (seg) de la primer crisis convulsiva inducida mediante la administración i.p. de un antagonista GABAérgico (PTZ, 60mg/Kg, esta dosis tiene una probabilidad de inducción de crisis convulsiva del 90%). Para el grupo control de ratas hembras Ovx (N=5) la administración de PTZ indujo una crisis tónico clónica con latencia promedio de 57 ± 4 seg. En el grupo de animales Ovx con un SAD, la primera crisis se originó a los 62 ± 4 seg. (Fig. 19). De esta manera constatamos que la abstinencia a Dz no modifica la latencia de la primera crisis en ratas Ovx. Otro grupo de animales con SAD pero que recibieron E (N=5), la latencia fue de 54 ± 1 seg, semejante a lo cuantificado en el grupo de ratas Ovx con tratamiento Salina+E/P (N=14) cuya latencia fue de 56 ± 2 seg. El mismo tratamiento secuenciado de esteroides sexuales E/P en animales que desarrollaron un SAD (N=11) la latencia fue de 65 ± 5 seg. Llama la atención que las ratas Ovx con un SAD a las cuales solamente se les administró P, la latencia de la primer crisis convulsiva fue de 81 ± 14 , sin embargo, esta reducción en la excitabilidad del SNC no fue significativa. En resumen, los resultados en la medición del tiempo en el que aparece la primera convulsión en los grupos de las hembras Ovx con diferentes tratamientos farmacológicos, no muestran diferencias estadísticamente significativas en este tiempo (Fig. 19).

VI.VIII Diferencia en la susceptibilidad a inducir crisis convulsivas en ratas hembras y ratas machos durante el SAD.

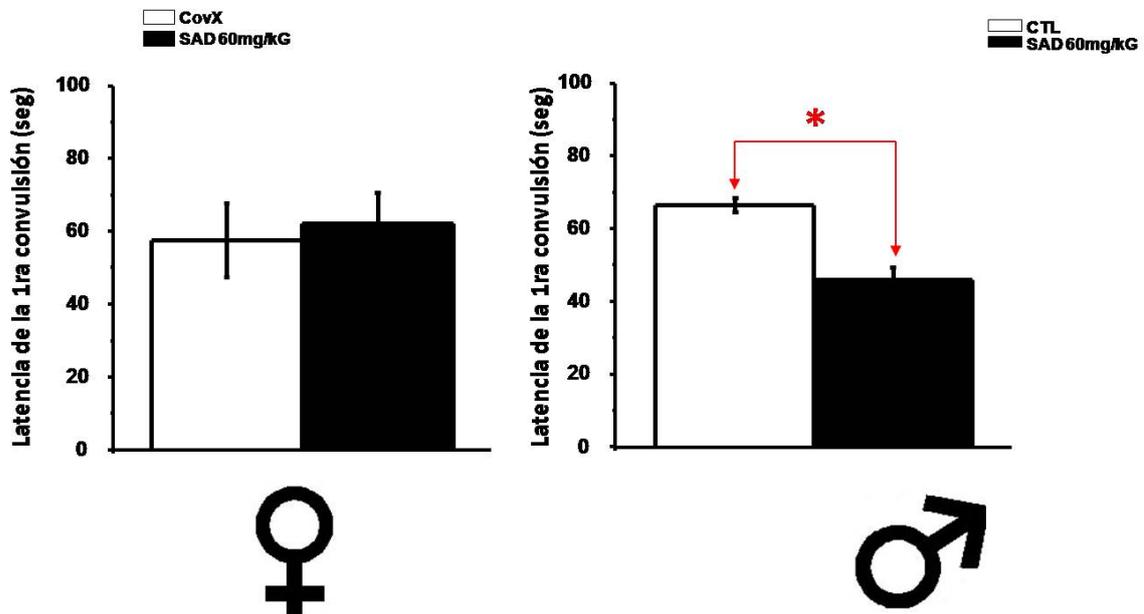


Figura 20. Diferencia en el incremento en la susceptibilidad de inducción de la primera crisis convulsiva durante el SAD en ratas hembras Ovx y machos. Se cuantificó la latencia (seg) de aparición de la primera crisis tónico clónica generada por PTZ (60mg/Kg). El umbral de génesis de crisis convulsivas no se modifica significativamente en las ratas hembras Ovx, en contraste, los machos si presentan una modificación del umbral de crisis convulsivas durante el SAD. Se aplicaron dos pruebas de validación estadística *t de student para grupos dependientes* y *t de student para grupos independiente*. **Covx**, hembra Ovx control (N=5), **CTL**, macho intacto control (N=11); **SAD**, hembras Ovx (N=5) y machos intactos, (N=13) con Síndrome de abstinencia a Diazepam, se graficó promedio de la primera crisis + EE, df=8; $p \leq 0.04$.

La susceptibilidad para inducir crisis convulsivas con PTZ en ratas macho tiene diferencias significativas con respecto a la de las ratas hembras Ovx, ya que existe una disminución de la latencia a las crisis en las ratas macho. La aplicación de 60mg/Kg de PTZ a ratas macho control (N=11), tuvo una latencia de inducción de la primera crisis tónico clónicas de 68 ± 2 seg; en contraste, la aplicación de la misma dosis de PTZ a ratas macho con SAD (N=5), la latencia de la crisis convulsiva es significativamente menor: 47 ± 3 seg (Fig. 20, $p \leq 0.04$).

La figura y 20 indican que existen diferencias en la susceptibilidad a generar crisis convulsivas entre los machos y las hembras Ovx. Independientemente del tratamiento farmacológico, la ovariectomía no reduce la protección a la inducción de epilepsia. Los grupos de ratas hembra Ovx tratados con los esteroides sexuales

(E y P) por separado o en secuencia, no reducen la latencia de la primera crisis. En contraste, las ratas macho muestran una disminución en la latencia para presentar una crisis convulsiva sólo en condiciones de un SAD, es decir, la hiperexcitabilidad del cerebro en estos animales es mayor.

VI.IX Registro de la actividad Electroencefalográfica antes y durante del SAD en ratas machos y hembras Ovx.

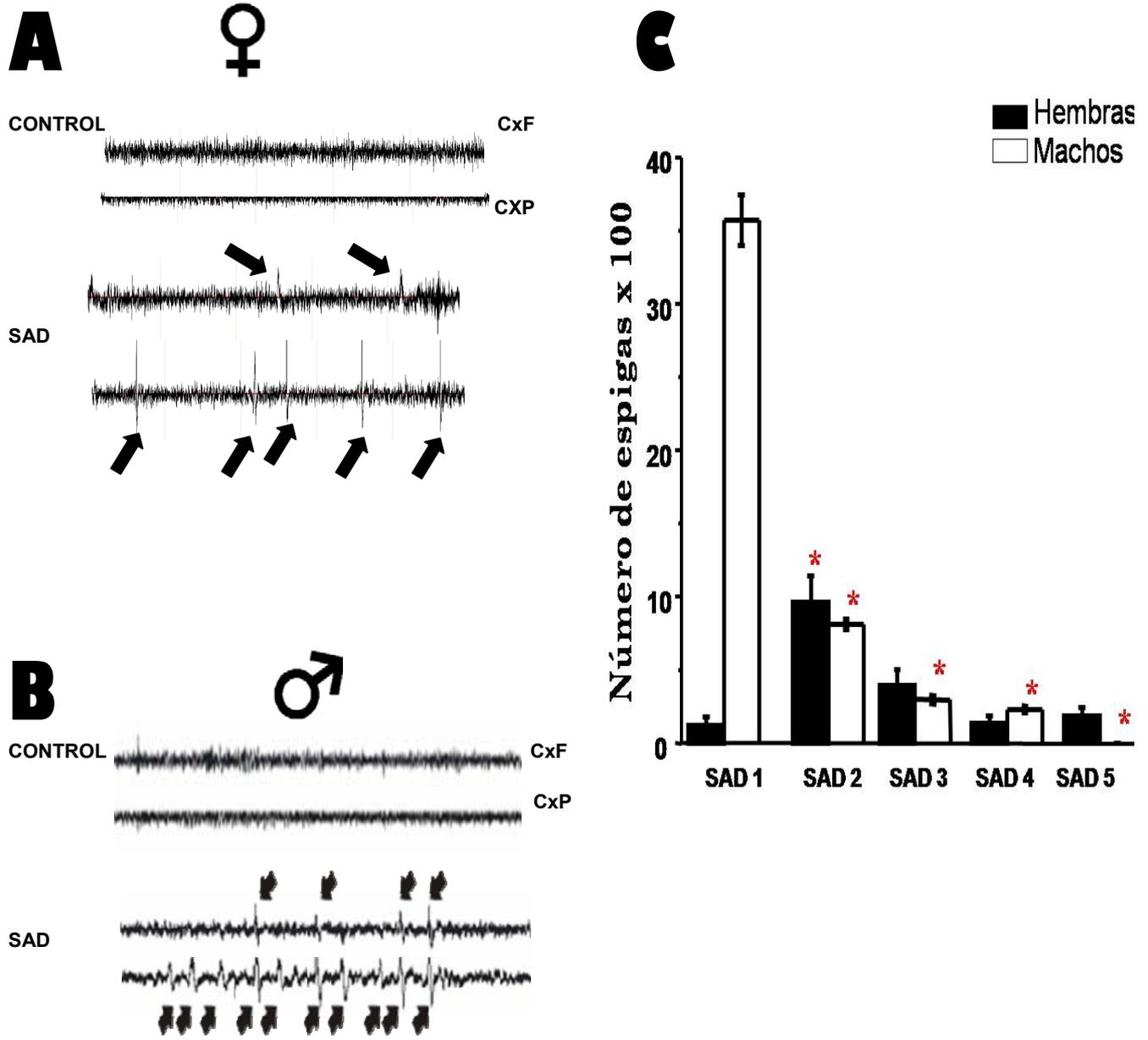


Fig. 21. A y B registros representativos del EEG durante el SAD mostrando la aparición de complejos espigonda para ambos sexos (hembras y machos respectivamente). C promedio del número de espigas durante los días del SAD para ambos sexos, se muestra media + EE. Se muestra la diferencia entre número de espigas para las ratas macho (barras blancas) y las ratas hembras Ovx (barras negra) en los 5 días de seguimiento del SAD. **SAD**, Síndrome de Abstinencia a Diazepam, **CxF**, Corteza frontal; **CxP**, Corteza Parietal, (* $p \leq 0.05$).

Debido a que hemos identificado en esta tesis que la abstinencia a Diazepam modifica la conducta sexual, incrementándola en hembras; genera ansiedad tanto a ratas macho como hembra, e incrementa la susceptibilidad de inducir crisis convulsivas en las ratas macho, la última serie de experimentos estuvo orientada a identificar a través del registro del EEG, la hiperexcitabilidad neuronal de la corteza cerebral que caracteriza a este estado inducido por la abstinencia de esta Benzodiacepina. El grupo de animales utilizados para el estudio del EEG estuvo formado por ratas hembra Ovx (N=7) y ratas macho intactos (N=8), a los que se les practicó una cirugía estereotáxica para el implante de electrodos de registro. Siete días después de la cirugía fueron sometidos al tratamiento de Diazepam (10 días, 7mg/Kg; i.p.) para cuantificar la actividad del EEG (0.1-300Hz) de las cortezas frontal (CxF) y corteza parietal (CxP) (Fig. 21A, B) antes (registro control) y después del tratamiento con Dz.

La interrupción abrupta del tratamiento con Dz indujo manifestaciones EEG de un síndrome de abstinencia. En las ratas hembras Ovx un día después de la última aplicación de la Benzodiacepina se observó la aparición de complejos espiga-onda espontáneos de alta frecuencia (0.15-0.2 Hz) y gran amplitud (descargas epileptiformes) entre 200-300 μ V, con una mayor proporción de esta actividad en la región parietal (Fig.21 A, C; barras negras).

Los complejos espigas-onda fueron observados en los 5 días después de la interrupción de la administración del fármaco en ratas hembras Ovx. El número de estos complejos en un periodo de 2h en el primer día del SAD fue de 122 ± 61 , sin embargo, en el día 2 del SAD se presenta un incremento significativo en el número de complejos espiga-onda de alta frecuencia: 966 ± 180 , permaneciendo durante los días tres al cinco del SAD. La frecuencia de las descargas en este estado de abstinencia fue disminuyendo gradualmente, de esta forma para el día tres del SAD se cuantificaron 395 ± 107 , el cuarto día 142 ± 49 y finalmente, el quinto día del SAD 188 ± 58 (Fig. 21C, barras negras).

Por otro lado, el registro de la actividad en ambas cortezas cerebrales durante 30 min posterior y la aplicación de Dz, reveló la inducción de actividad cortical a la aparición de una actividad lenta y sincrónica, lo cual es característico

del efecto de algunos antiepilépticos con actividad GABAérgica. Se presentó un incremento significativo en la banda de frecuencia de 0-25 Hz siendo de mayor intensidad en el primer día de la aplicación de Diazepam para ambos sexos (Fig. 22; Fig. 23). Al realizar un análisis del espectro de frecuencias de Wavelets este cambio en la amplitud se cuantifica con la adquisición de un color rojo en la gráfica del EEG. Es importante hacer notar que para las ratas hembras la amplitud se va reduciendo conforme avanza el tratamiento con la Benzodiacepina, este efecto no se cuantificó en los machos. La amplitud promedio de la actividad del lóbulo frontal, el primer día del tratamiento con Diazepam fue de $1058 \pm 210 \mu\text{V}$ que disminuyó significativamente el día 5 de tratamiento en el que se cuantificó una amplitud promedio de $760 \pm 15 \mu\text{V}$; $p \leq 0.02$ (29% menor, Fig. 22 A). Datos semejantes se observaron en el registro bipolar del lóbulo parietal (Fig. 22 B). En contraste, en las ratas macho, el incremento de la amplitud del EEG inducido por la aplicación de Diazepam, mostró que este incremento no se reduce; la amplitud promedio en el día 1 fue $1122 \pm 19 \mu\text{V}$ mientras que el día 5 es de $970 \pm 377 \mu\text{V}$ ($p \leq 0.05$, sólo disminuye un 14%, Fig. 23 A).

El grupo de ratas macho que recibió el mismo tratamiento crónico de Dz y su abrupto retiro, muestra que los resultados del EEG tienen algunas similitudes con respecto al grupo de ratas hembras Ovx. El EEG del SAD en ratas macho también muestra la aparición de descargas epileptiformes, los complejos de espiga onda también son de gran amplitud y alta frecuencia como en las ratas hembras Ovx, sin embargo, en el seguimiento temporal del patrón de frecuencia se perciben algunas diferencias: en el grupo de ratas macho con SAD el día uno de abstinencia es posible identificar la máxima excitabilidad cortical, el número de espigas cuantificado en un periodo de registro de EEG de 120 min fue 3574 ± 170 . La frecuencia de las descargas paroxísticas se fue reduciendo gradualmente hasta desaparecer en el día cinco del SAD. De esta forma, en el día dos del SAD se cuantificaron 830 ± 30 complejos. El día tres del SAD 318 ± 31 espigas-onda, en tanto que el día cuatro del SAD, se midieron 254 ± 29 espigas (Fig. 21B, C barras blancas).

El análisis del espectro de frecuencia de Wavelets para el EEG de machos y hembras reveló algunas diferencias que el análisis simple del EEG no evidenció: la amplitud promedio en el espectro de la frecuencia de 0-25 Hz que se cuantificó en el lóbulo frontal y el lóbulo parietal tienen diferencias en los cerebros de machos y hembras. El lóbulo frontal de las hembras Ovx mostró que durante la abstinencia a Dz se presenta un aumento de la potencia del EEG ($614 \pm 66 \mu\text{V}$, Fig. 22 A), en contraste el cerebro de las ratas macho muestra mayor amplitud en el lóbulo parietal ($521 \pm 193 \mu\text{V}$, Fig. 23 B). Estos resultados señalan que el lóbulo frontal en las ratas hembra Ovx es 55% más activo que el lóbulo parietal, mientras que en el caso de las ratas macho el lóbulo parietal presenta una activación 46% mayor (Fig. 22 A y 23 B).

Espectros de frecuencia antes, durante y después del tratamiento con Diazepam en ratas hembras Ovx.

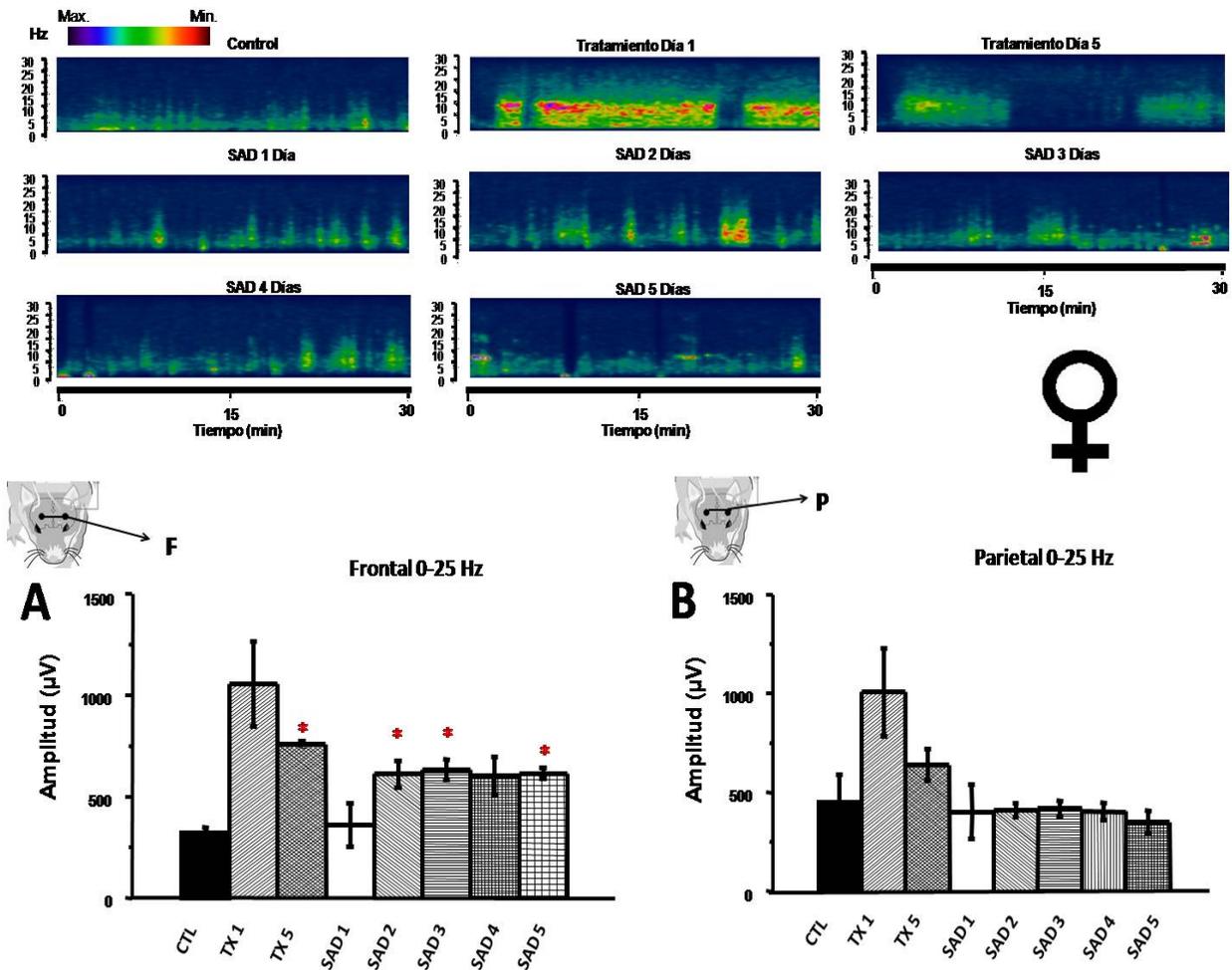


Fig. 22 En la parte superior se muestran los espectros de frecuencia (30 min.) representativos del lóbulo Frontal de ratas hembras Ovx. Se analizó una banda de frecuencia de 0-25 Hz durante el desarrollo temporal del experimento. El aumento de la potencia se ve reflejado en un color rojo más intenso, mientras que a menor actividad predomina el color azul. **A** representa la potencia (µV) del EEG del lóbulo Frontal antes, durante y después del tratamiento con Diazepam. **B** representa la potencia (µV) del EEG del lóbulo Parietal antes, durante y después del tratamiento con Diazepam. Se muestra el promedio de potencia \pm EE para cada lóbulo. **CTL**, control, **TX1**, tratamiento día 1, **TX5**, tratamiento día 5, **SAD1-5**, días 1 al 5 de la abstinencia a Diazepam. Hz, Hertz, (* $p \leq 0.04$).

Espectros de frecuencia antes, durante y después del tratamiento con Diazepam en ratas macho.

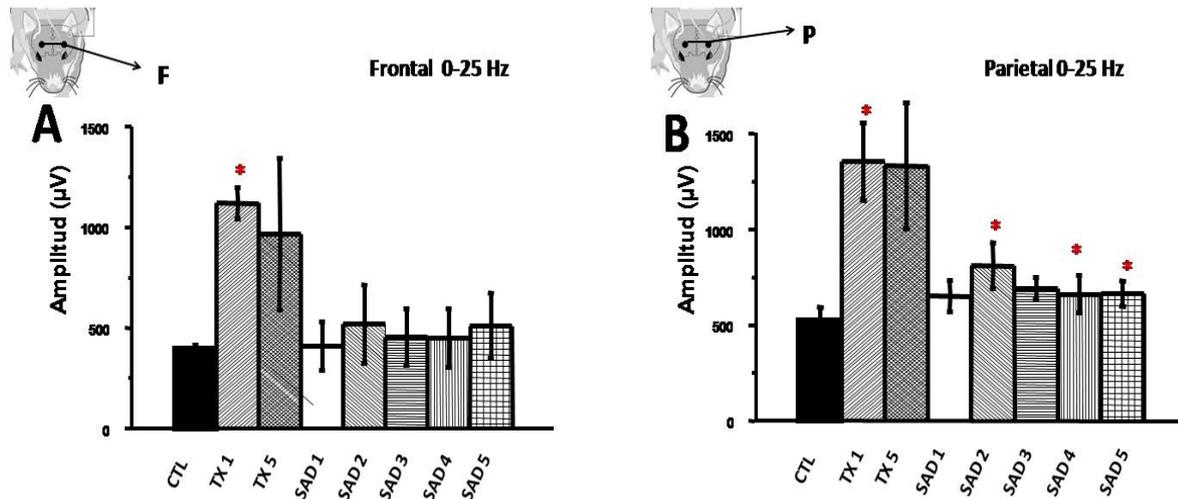
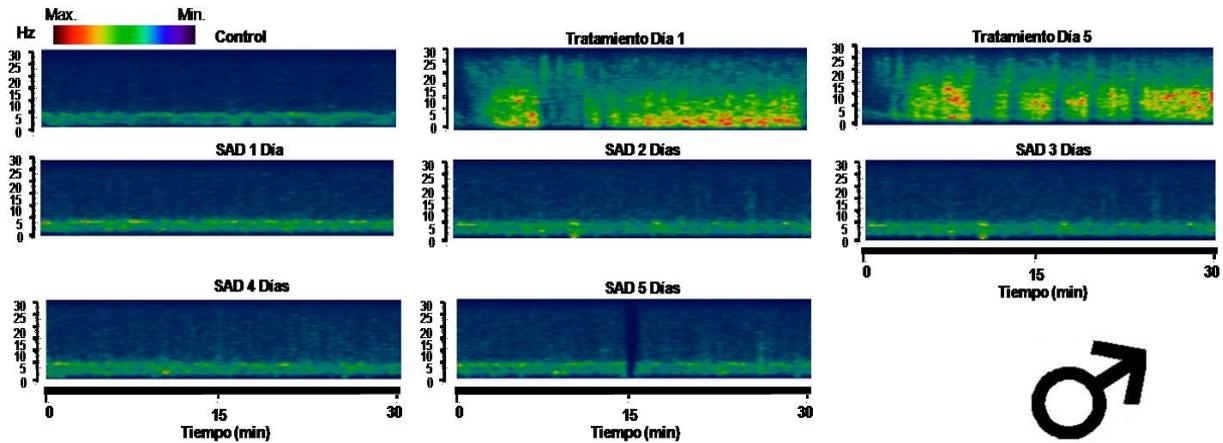


Fig. 23 En la parte superior se muestran los espectros de frecuencia (30 min.) representativos del lóbulo Parietal (P) de ratas macho. Se analizó una banda de frecuencias de 0-25 Hz durante el desarrollo temporal del experimento. El aumento de la potencia se ve reflejado en un color rojo más intenso, mientras que a menor actividad predomina el color azul. **A** representa la potencia (μV) del EEG del lóbulo Frontal (F) antes, durante y después del tratamiento con Diazepam. **B** representa la potencia (μV) del EEG del lóbulo P antes, durante y después del tratamiento con Diazepam. **CTL**, control, **TX1**, tratamiento día 1, **TX5**, tratamiento día 5, **SAD1-5**, días 1 al 5 de la abstinencia a Diazepam. **Hz**, Hertz. Se muestra el promedio de potencia \pm EE para cada lóbulo, $p \leq 0.05$.

Resumen de Resultados en las Diferentes Pruebas Conductuales

GRUPOS	COv	Ovx	Ovx SAD	Ovx SAD+E	Ovx SAD+P	OVX+E/P	Ovx SAD+E/P	MACHOS CTL	MACHOS SAD
1. CONDUCTA SEXUAL									
NÚM DE LORDOSIS	NA	0	0	0	0	8±0.91	9.9±0.1 *p≤0.0475	NA	NA
COCIENTE DE LORDOSIS	NA	0	0	0	0	63.4±8.57	75.92±6.77	NA	NA
MONTAS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	22.4±1.74	19.5±2.1
INTROMISIONES	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	18±2.5	14.75±2.3
2. PERFIL ANSIOGÉNICO									
ENTRADAS BA	3.25±0.85	3.75±1.03	1.6±0.7 *p≤0.0054	9±0.89 *p≤0.0001	2.6±0.67	6.38±1.17	6.81±1 *p≤0.00111	8.22±1.25	3.2±1.39 *p≤0.0253
ENTRADAS BC	3.75±1.03	11±2.2	14.6±4.6	4.2±0.80 *p≤0.0291	5.6±1.8	11±1.6	13.63±1.17	12.88±2.71	18.4±1.12
%TBA	49.57±5.94 *p≤0.0095	21.1±5.4	6.26±4.97	79.18±6.7 *p≤0.0001	24.04±17.57	32.17±5.06	26.33±6.3	34.87±8.08	3.78±2.09 *p≤0.0098
%TBC	50.42±5.94 *p≤0.0095	78.9±5.4	93.74±6.7	20.82±6.7 *p≤0.0001	75.96±17.57	67.82±5.06	73.66±6.3	65.12±8.08	89.62±3.57 *p≤0.0242
3. SUSCEPTIBILIDAD A CONVULSIONES (Dosis de PTZ 60mg/Kg)									
LATENCIA (S)	NA	57.6±4.6	62.2±3.8	54.8±1.85	81.8±14.91	56±2.3	65±5.35	68±2	47±3.6 *p≤0.04

Tabla 1. Se muestran las Medias y el EE para cada prueba: **1) Conducta Sexual:** las diferencias mostradas son por sexo con respecto al grupo Ovx+E/P y el grupo Ovx SAD+E/P, p≤0.05. **2) Perfil Ansiogénico:** comparación entre grupos para cada sexo con un valor de p≤0.05. **3) Susceptibilidad a Convulsiones por PTZ:** comparación entre grupos para cada sexo con un valor de (p≤0.05). NA= No Aplica

Resumen de resultados en el EEG durante el SAD

1. No. de espigas en el EEG durante un SAD		
	HEMBRAS Ovx	MACHOS
<i>SAD día 1</i>	12.2±6.1	357.52±17.4
<i>SAD día 2</i>	96.6±18 *p≤0.0436	81.63±3.5 *p≤0.0004
<i>SAD día 3</i>	39.5±10.7	30.16±2.88 *p≤0.0002
<i>SAD día 4</i>	14.2±4.98	23.43±2.39 *p≤0.0002
<i>SAD día 5</i>	18.88±5.88	1.45±0.5 *p≤0.003
2. Promedio de la potencia del EEG durante el SAD		
	HEMBRAS Ovx (Frontal)	MACHOS (Parietal)
<i>Control</i>	322±28	529±67
<i>Tratamiento día 1</i>	1058±210	1358±203 *p≤0.0083
<i>Tratamiento día 5</i>	760±15 *p≤0.0248	1334±330 *p≤0.0381
<i>SAD día 1</i>	363±107	654±82
<i>SAD día 2</i>	614±66 *p≤0.0322	813±121 *p≤0.0485
<i>SAD día 3</i>	636±50 *p≤0.0122	694±57
<i>SAD día 4</i>	604±92	663±97 *p≤0.0384
<i>SAD día 5</i>	617±26 *p≤0.0155	667±66 *p≤0.0384

Tabla 2. Se muestran los promedios ± EE para cada sexo. **1) Número de espigas durante el SAD:** diferencia entre el número de espigas mostrados por día durante el SAD, en relación al primer día de aparición de las espigas; **2) Promedio de potencia del EEG previo, durante y después de la aplicación de Diazepam:** comparación por sexo en el seguimiento del registro del EEG, en relación al grupo control; (*p≤0.05).

VII. Discusión

La presente tesis es un estudio secuencial de tres enfoques complementarios e interdependientes: conductual (sexual y ansiedad), farmacológico y electrofisiológico. La hipótesis general de este trabajo fue identificar las modificaciones que se dan durante el SAD en la conducta sexual, la ansiedad y la susceptibilidad de generar crisis convulsivas en la rata macho y la rata hembra Ovx. Queda de manifiesto que el cerebro de las ratas es susceptible a modificar su excitabilidad por la interrupción de la administración de Dz y el impacto que esto tiene en la neurotransmisión GABAérgica.

Los resultados indican que el SAD incrementa la conducta sexual en las ratas hembras Ovx y no en las ratas macho: las ratas hembras Ovx incrementan la conducta lordótica durante la abstinencia; la rata hembra se hace más receptiva, dispuesta a tener un encuentro copulatorio (Fig. 14, tabla 1). El número de montas e intromisiones de la rata macho no se modifica por la abstinencia a la Benzodiazepina (tabla 1). El patrón de ansiedad durante el SAD para ambos sexos es semejante (Fig. 17, tabla 1) sin embargo, la rata macho es más susceptible de generar una crisis convulsiva por la administración de PTZ (Fig. 20, tabla 1). La abstinencia a Dz se caracteriza por un incremento significativo de la actividad de la corteza cerebral, que se asocia a un cambio en la sensibilidad GABAérgica. La actividad hiperexcitable neuronal en el EEG tienen una latencia de 24 h y una duración promedio de 5 días. En este periodo, el SAD se caracteriza por la presencia de complejos espiga-onda (Fig. 21 A y B, tabla 2) y cambios en el patrón del espectro de frecuencia de Wavelets (se analizó las frecuencias de 0-25 Hz, Fig. 22 y 23); asimismo, las ratas macho muestran un patrón de mayor excitabilidad en el día 1 de la abstinencia, sin embargo, ambos sexos son semejantes en la evolución del EEG de la abstinencia a partir del segundo y hasta el quinto día del SAD (Fig. 21 C).

Este modelo basado en una hiperexcitabilidad neuronal por inducción de una abstinencia a un fármaco GABAérgico, en la exposición crónica y su posterior interrupción de su administración en forma abrupta, ha sido estudiado por nuestro grupo de trabajo en diversos estudios (Calixto et al, 2000; Brailowsky,

1991; 1988; 1987; Casasola et al, 2004). Nosotros hemos identificado que diversos fármacos como el GABA, el alcohol, los barbitúricos y los neuroesteroides, tienen en común, que su abstinencia incrementa la actividad neuronal (Brailowsky et al, 1988, Calixto et al, 2000; Mellerio, 1980; Smith et al, 1998; 2007).

El modelo de abstinencia a Dz que describimos en esta tesis, tiene similitudes muy grandes al incremento de la excitabilidad neuronal generado por la abstinencia a GABA (SAG), en el cual existen modificaciones en la neurotransmisión GABAérgica a nivel pre-sináptica (disminución en la síntesis y liberación de GABA) y a nivel post-sináptico (cambios en el receptor GABA_A y su conformación) que a su vez, modifican la sensibilidad farmacológica del receptor (Calixto et al, 2000; Casasola et al, 2004).

Es conocido que algunos moduladores alostéricos positivos como el Dz y los neuroesteroides incrementan la expresión de la subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A, este evento se asocia a una disminución de la subunidad $\alpha 1$. Cuando la duración de las administraciones de estos agonistas son mayores a un mes, existen cambios en las subunidades $\alpha 5$, reduciéndose su expresión mientras hay un incremento en la expresión de las subunidades $\alpha 3$ y $\alpha 6$ (Ator, 2010). Sin embargo, la abstinencia a algunas Benzodiazepinas (Clonazepam y Diazepam) también se han relacionado con un incremento en la neurotransmisión glutamatérgica (incremento de la función de los receptores AMPA (Xiagnk y Tietz, 2007) y NMDA (Shen y Tietz, 2011). El incremento en la actividad del receptor AMPA se explica por el incremento en la expresión de la subunidad glu-1 (Izzo et al, 2001; Alison et al, 2005). Es importante mencionar que dependiendo de la vía de administración del Dz, los cambios farmacológicos de la abstinencia pueden ser diferentes, por ejemplo, la administración i.p. induce una abstinencia la cual tiene como característica, que la unión del agonista sobre el receptor AMPA es corta (K_d en medida en μs), sin embargo, si la administración es subcutánea la tasa de unión al mismo receptor se incrementa (K_d en ms; Allison y Pratt, 2006; Steppuhn y Turski, 1993).

Otras neurotransmisiones que pueden estar involucradas en la neurobiología del incremento de la excitabilidad neuronal inducida por la abstinencia a Dz, es el incremento de la actividad serotoninérgica (Langen y Rundfeldt, 2007) asociado con una disminución de la actividad colinérgica (Rada y Hoebel 2005). Un evento postsináptico asociado al incremento de la excitabilidad neuronal por la abstinencia a las Benzodiazepinas es el incremento de calcio intracelular debido al aumento en la densidad de canales dependientes de voltaje tipo L, semejante a lo que sucede en las epilepsias y en el SAD (Katsura et al, 2007; Brailowsky, 1991).

El conjunto de estas evidencias: 1) disminución de la actividad GABAérgica, 2) incremento de la actividad glutamatérgica, 3) incremento de la actividad serotoninérgica, 4) disminución de la neurotransmisión colinérgica y 5) una regulación al aumento de canales de calcio tipo L (Katsura et al, 2007), pueden explicar parcialmente el incremento de la actividad neuronal que se suscita en el SAD. Sin embargo, es necesario hacer notar que evidencias de diversos experimentos sugieren que evolutivamente son primero los cambios en la neurotransmisión GABAérgica y gradualmente se van instalando las modificaciones en los diferentes neurotransmisores (Caputo y Bernardi, 2010, Uzun et al, 2010., Autier et al, 2009).

VII. I Cambios en la conducta sexual por el SAD, efectos diferenciales en rata macho y rata hembra Ovx.

Diversas evidencias experimentales indican que los esteroides sexuales (E y P) modifican la respuesta sexual en roedores, modulando esta actividad a través de muchas regiones del cerebro. Sin embargo, las estructuras más importantes implicadas en la generación de la actividad sexual son: el núcleo ventro-medial del hipotálamo (VMH) y el área-tegmental-ventral (VTA). En ambas estructuras se expresan receptores para E y P, sin embargo, el consenso indica que en el VMH, la actividad de los E y P es a través de una interacción con receptores intracelulares. En tanto que, en el VTA, la actividad es regulada por modulación

alostérica por distintos neurotransmisores a través de receptores membranales (Frye y Paris 2010).

En las hembras los efectos de la actividad de los E y la P son un bioensayo para identificar la actividad de estos esteroides neuroactivos sobre la inducción de la lordosis. La acción secuencial de E y P en el SNC determina el inicio y la duración de la actividad sexual en roedores.

Los E son responsables de muchas actividades fisiológicas y patológicas en el cerebro, por ejemplo: estrés, memoria, atención. Es importante señalar que estas hormonas están relacionadas con la liberación de muchos neurotransmisores en tratamientos a largo plazo. En el hipocampo (Zheng, 2009) incrementan o favorecen la liberación de glutamato, acetilcolina y noradrenalina e inhiben la del GABA. En otras palabras, el efecto de la aplicación crónica de E tiene una importante modulación presináptica, que tiene a un incremento en la liberación de neurotransmisores excitadores, favorece el disparo neuronal y la proceptividad sexual, lo anterior podría explicar parcialmente la inducción de la conducta sexual observada en esta tesis. Sin embargo, por sí solos E o P, no inducen la conducta sexual, es necesaria la administración secuenciada de E y posteriormente de P para inducir la conducta sexual femenina en la rata hembra. La densidad de receptores intracelulares de P de las neuronas del VMH son modulados por el E. En contraste, evidencias recientes (Walf y Frye, 2010) indican que la aplicación de E y análogos en forma aguda reducen la ansiedad y la depresión en roedores. Este efecto no altera la conducta motora o la coordinación muscular, el posible sustrato de esta actividad es por cambios en la neurotransmisión GABAérgica y la modulación del calcio intracelular. En este trabajo se identificó el efecto agudo de una aplicación de estradiol subcutáneo sobre la ansiedad (Fig. 15). Estos resultados son acordes a los reportados por Walf y Frye (2010), en el cual se ve claramente la diferenciación del efecto que tienen los E en el SNC: si su aplicación es aguda tienen efectos ansiolíticos y antidepresivos (modulación postsináptica), sin embargo, cuando la aplicación es crónica estas hormonas (los E) se comportan como neuroexcitadores (modulación presináptica. Frye y Paris 2010).

En roedores hembras la instilación directa de E/P en el VMH, induce proceptividad y receptividad. Los efectos son potenciados si la P se aplica también en el VTA (Frye et al, 2011; Frye y Paris, 2010). Lesiones en el VMH o en el VTA suprimen o disminuyen la lordosis en ratas. La importancia de las conexiones entre el VMH y el VTA revela una íntima relación fisiológica sobre la cual los esteroides (E y P) juegan un papel fundamental. El modelo descrito por Frye y Minerva (2009, 2011) señala que los esteroides sexuales, la P y la Alop; interactúan en el VMH a través de receptores intracelulares cuyo mecanismo de acción es dependiente de una actividad genómica; es decir, que la P inicia la lordosis por una inducción de transcripción de genes, cuya latencia y duración son de horas y días (Frye, 2001).

En contraste, las acciones de la P y la Alop en el VTA son independientes de sus receptores intracelulares. El VTA se relaciona con el sistema mesolímbico los neuroesteroides (P y AloP) modulan en una forma alostérica positiva al receptor GABA_A en esta área; es decir, que la actividad de estos progestágenos en el VTA es a través de una actividad no genómica, su latencia y duración de los efectos en este núcleo, es de segundos a minutos. No se descarta la actividad de receptores específicos membranales para estas hormonas, sin embargo, la activación GABAérgica es fundamental en la inducción de la lordosis por activación del VTA (Frye y Paris, 2009).

La P tiene una relación directa con la función reproductiva y función gonadal. La P inhibe la liberación de glutamato, acetilcolina y dopamina en diversas estructuras del SNC, asimismo se relaciona con un incremento en la actividad GABAérgica (Zheng, 2009). La P y sus derivados están relacionados con una actividad pre y post-sináptica. La función presináptica, en una reducción en la liberación de neurotransmisores excitadores que favorece la actividad inhibitoria de la membrana post-sináptica. Esto también podría ser la base de los efectos reductores de la ansiedad de la aplicación de la P durante el SAD cuantificados en esta tesis.

Diversos agonistas GABAérgicos incrementan la actividad lordótica en la rata cuando se aplican directamente en el VTA y en contra parte, antagonistas de

este receptor reducen la proceptividad sexual de los roedores hembra (Frye y Paris, 2009). En el VTA también existe actividad de receptores a diversos neurotransmisores que están co-localizados con los receptores GABA_A, modulando la proyección dopaminérgica en este núcleo. Los receptores a dopamina (D1) pueden ser modificados en la lordosis. La densidad de receptores D1 tiene una relación directa en el periodo del diestro (Levesque et al, 1989). Por lo tanto, la dopamina y la Alop hacen más receptivas a las ratas (Frye 2001), la infusión de un antagonista D1 en el VTA aumenta la lordosis (Frye y Petralia 2006). De esta manera en el VTA, la actividad GABAérgica y dopaminérgica son fundamentales en la facilitación de la lordosis.

En esta tesis la administración crónica y la interrupción abrupta de un agonista GABAérgico como el Dz, incrementa la lordosis significativamente en la rata hembra Ovx pero no cambia la conducta sexual de la rata macho. Los datos sugieren de acuerdo al modelo de Frye, que la abstinencia a Dz involucra directamente al VTA y no al VMH. Los trabajos de Beyer (Fernández-Guasti et al, 1986), señalan que el bloqueo de la actividad GABAérgica en el VMH no modifica la conducta sexual de las ratas hembras. Nuestros resultados obtenidos en esta tesis apoyan y están de acuerdo al modelo propuesto por Fernández y Beyer (1986) y Frye (2009). Es necesario enfatizar que la conducta sexual de la rata hembra Ovx solo se puede inducir cuando las ratas son tratadas secuencialmente con E y P, ya que por sí sola la abstinencia a Dz fue incapaz de inducir la actividad sexual. De esta manera, el incremento de la actividad en el VTA que puede generarse por la abstinencia a Dz es consecuencia de la actividad de los esteroides sexuales (E y P) que se ve potenciada por la modulación alostérica del receptor GABA_A en el VTA. Por otra parte, se ha descrito que la síntesis de neuroesteroides se incrementa significativamente con un tratamiento crónico con Benzodiacepinas, de tal manera que, el tratamiento crónico de Dz en forma independiente de la modulación alostérica de GABA_A, incrementa la producción de esteroides sexuales en el cerebro (Drexler et al, 2010; Martín-García, 2007; Souza et al, 2008; Baulieu et al, 2001). Por lo que la explicación del incremento de la conducta sexual por la abstinencia al Dz puede ser consecuencia de: 1)

incremento de la producción de esteroides por el tratamiento de Dz y 2) una modulación alostérica positiva del receptor GABA_A en el VTA.

La testosterona es responsable de la inducción de la conducta sexual en la rata macho, este esteroide permite la modulación de liberación dopaminérgica en el sistema límbico, de vasopresina y oxitocina, lo cual involucra estructuras distintas para la inducción de la conducta sexual en contraste con la rata hembra. Es decir, a diferencia del cerebro de las hembras, la modulación de esteroides sobre la actividad GABAérgica el cerebro del macho tiene distintos aspectos anatómicos, fisiológicos y neuroquímicos significativos (Gil et al, 2010). Las áreas de los núcleos paraventriculares, hipotálamo ventromedial, hipocampo, área preóptica medial, son fundamentales en la rata macho para la expresión de su conducta sexual (Joshansen et al, 2008).

La testosterona es la hormona sexual responsable de varios efectos en el cerebro entre ellos la memoria, el aprendizaje y la liberación de neurotransmisores y también es responsable del incremento de liberación de dopamina en el área preóptica medial (Hull et al, 1997, 1995). La significancia de este hecho es que los machos se hacen más receptivos a las hembra e incrementan su actividad copulatoria (Melis et al, 1995). A nivel post-sináptico, la testosterona también ejerce efectos moduladores alostéricos positivos sobre el receptor GABA_A (Reedy y Jian 2010). En esta tesis se evaluó la conducta sexual en ambos sexos. En las hembras al haber sido ovariectomizadas la producción basal de esteroides esta disminuida. Paradójicamente el tratamiento con Dz puede modular positivamente la producción de neuroesteroides. Por lo que la aplicación secuenciada de E/P favorece la aparición de conducta sexual. En contraste, las ratas macho tienen niveles constantes de testosterona.

Trabajos previos de Fernández-Guasti (1986) indican que el bloqueo de la actividad GABAérgica en machos en el área preóptica tiene un impacto positivo en la conducta sexual, sin embargo, la aplicación puntual en otras estructuras límbicas no modifican el comportamiento sexual. Estos trabajos en relación a los resultados de esta tesis indican que el hipotálamo es un área directamente relacionada con el inicio de la conducta sexual de los roedores macho y presenta

una íntima relación con la neurotransmisión GABAérgica, lo que lo hace funcional y anatómicamente distinto de la rata hembra.

En resumen, durante el SAD existe un incremento en la actividad neuronal por una reducción de la actividad GABAérgica. Esto contribuye a la aparición de ansiedad en ambos sexos y modifica la conducta sexual de las ratas hembras. Diversas estructuras del sistema nervioso central las cuales tienen mayor densidad de neuronas GABAérgicas también están involucradas con el desarrollo de la conducta sexual. De esta manera el SAD contribuye a las modificaciones pre y post- sinápticas que realizan las hormonas esteroides sexuales. Las hembras que tienen una mayor cantidad de esteroides derivados del pregnano presentan los cambios conductuales más evidentes: tienen mayor actividad sexual (Fig. 13 y 14).

VII.II Cambios en la ansiedad generados por el SAD

La ansiedad en los mamíferos es una actividad que responde a la función del Sistema Nervioso Autónomo, amígdala e hipotálamo se incluyen signos y síntomas como: un incremento en la frecuencia cardíaca, la respiratoria que puede llegar a la disnea, incremento en las sensaciones y disminución en la atención, vértigo y debilidad. La ansiedad puede ser heredable como un trastorno que afecte la salud mental, sin embargo, desde el punto de vista experimental, ésta puede estimarse por el incremento de la actividad cortical en mamíferos, una conducta de incremento en la reactividad a estímulos o una disminución en los procesos de atención.

La reacción más frecuente de la ansiedad es el miedo y la nula objetividad ante los estímulos (un estado de alerta continúa ante el peligro). Independientemente de la causa de la ansiedad, este proceso es común en la vida adulta y epidemiológicamente es más común en las mujeres que en los hombres (Wittchen et al, 1994). Biológicamente, una explicación por la cual las hembras reportan más cuadros de ansiedad es por el sustrato hormonal relacionado con la abstinencia a P y sus derivados, y el efecto que tiene esta con la neurotransmisión GABAérgica (Frye, 2001).

El laberinto elevado en cruz es un instrumento cuantitativo en el cual se puede medir la presencia de ansiedad en los roedores, este modelo resulta altamente reproducible y con una alta validez en la conducta de los mamíferos. La cuantificación farmacológica de ansiolíticos en este instrumento lo hace válido experimentalmente. Uno de los signos característicos de las abstinencias como la del alcohol y algunos fármacos (Barbitúricos, Benzodiazepinas) es la aparición de la ansiedad en los primeros estadios. Por lo que resultó lógico y práctico medir la ansiedad durante el SAD en su primera fase de instalación.

En las figuras 15-18, se muestran que los animales tanto machos como hembras durante el SAD tuvieron el mismo componente de inducción de ansiedad: incremento en el tiempo de permanencia y número de entradas a brazos cerrados del laberinto.

En relación a las ratas hembras (Fig. 15-16), las ratas Ovx presentaron ansiedad con respecto a las ratas no Ovx, es decir, la ovariectomía condiciona a un estado de ansiedad. Esta ansiedad basal puede explicarse por la disminución importante o ausencia de las hormonas sexuales. Esto ha sido validado en roedores, a los cuales la administración aguda de E produjo un efecto ansiolítico y que ha sido previamente reportado por diversos investigadores (Walf y Frye 2008; Osborne et al, 2009). El mecanismo por el cual se pueden suscitar estos efectos, son debidos a que los E incrementan la liberación de GABA (Zheng, 2009) e incrementan la síntesis de GABA aumentando la expresión de las enzimas GAD 65 y 67 en el área preóptica medial (Curran-Rauhut y Petersen, 2002). Esto sugiere que los E producen una modulación presináptica sobre la neurotransmisión GABAérgica. En este contexto, la administración de P también genera efectos ansiolíticos, pero no tan marcados como los que se observan con los E. Esto indica que las ratas no Ovx, puedan tener una menor probabilidad de inducción de ansiedad en las etapas del Estro y el proestro.

Se conoce que la P y sus derivados reducidos (como la AloP) son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, la exposición aguda a estas moléculas incrementa la actividad inhibitoria del GABA, se sabe que éstos neuroesteroides tienen potentes efectos hipnóticos, antiepilépticos y por ende

ansiolíticos (Martín-García, 2007; Fernández-Guasti, 1999). Sin embargo, llama la atención que la administración secuencial de estos dos esteroides: primero E seguidos de la aplicación de P, no modifica el componente ansiogénico de las ratas Ovx. Estos datos son semejantes a los publicados previamente por Martínez-Mota (2000). Nuestros resultados indican que farmacológicamente se bloquean los efectos ansiolíticos de ambas hormonas debido a que posiblemente la actividad genómica de ambos esteroides es mayor que la actividad no genómica desarrollada por separado de cada una de ellos. De acuerdo al modelo de McEwen, Gee y Majewska (1992) los efectos de la actividad de ambos esteroides son de tipo genómico cuando coadyuvan su actividad, en tanto que su efecto no genómico (modulación de diversas neurotransmisiones) pueden observarse cuando son aplicados en forma separada. En estas condiciones de ansiedad persiste la conducta sexual en las ratas Ovx, es decir, la actividad del VMH (él cual su función depende de la actividad genómica de los esteroides) es mayor, por lo que estas ratas que tienen ansiedad siguen presentando conducta sexual, es decir, el efecto coadyuvante de E y P es más genómico que GABAérgico.

Finalmente, el grupo de ratas Ovx con SAD que recibió la aplicación secuenciada de E y P no modificó los valores de ansiedad. En las condiciones de hiperexcitabilidad neuronal que caracterizan al SAD la modificación de las diversas neurotransmisiones mencionadas anteriormente (GABA, glutamato, serotonina, así como cambio en la densidad de los canales de calcio), hacen que los esteroides disminuyan su efecto ansiolítico. Es decir, que la modulación sobre diversos sistemas de neurotransmisión que tienen los esteroides sexuales se modifica en las condiciones de abstinencia, ya que el tratamiento crónico con Diazepam producen cambios en la sensibilidad farmacológica de los receptores de diversos neurotransmisores. Este grupo de animales tiene un incremento en la conducta sexual, lo cual fortalece la hipótesis de que se encuentra aumentada la actividad genómica en varias estructuras del SNC, en especial el VMH. Asimismo, pueden ocurrir cambios en la actividad GABAérgica durante el desarrollo de la conducta sexual, investigaciones publicadas previamente indican que el bloqueo de la actividad GABAérgica por picrotoxina y bicuculina (Fernández-Guasti, 1985)

incrementa la actividad sexual de las ratas hembra, semejante a lo que reportamos en esta tesis. De esta manera nosotros planteamos que el principal factor molecular que acompaña a las abstinencias de diversos fármacos GABAérgicos en su etapa temprana es la desensibilización y cambios en las subunidades que componen al receptor GABA_A, por lo que la aparición de la ansiedad y el incremento de la conducta sexual de las ratas hembras Ovx con SAD pueden tener éste sustrato en común.

El grupo control de ratas macho mostró que no hay diferencias significativas en el número de entradas a brazos cerrados y brazos abiertos, como tampoco en el tiempo de permanencia en estos brazos, es decir, los animales macho en condiciones basales no presentaron ansiedad. En contraste grupos de animales que recibieron un tratamiento crónico con Dz condiciona la aparición de ansiedad. A diferencia en lo cuantificado en las ratas hembras Ovx sobre las cuales la administración de esteroides sexuales puede reducir la ansiedad, las ratas macho que tienen niveles de testosterona constantes, la ansiedad aparece como una característica de estadios iniciales de la abstinencia a Dz. En estos animales la neurotransmisión GABAérgica es modulada por la testosterona la cual no tiene cambios cíclicos, su actividad de agonista sobre el receptor GABA_A tiene menor potencia que la P y sus derivados. Lo anterior indica que el SNC de los machos para desarrollar una ansiedad por abstinencia a una Benzodiacepina está favorecido comparándolo con el cerebro de la hembra, ya que como se analizó anteriormente, el cerebro de la hembra cambia su susceptibilidad para generar ansiedad de acuerdo a los niveles hormonales de sus esteroides sexuales (E y P).

VII.III Diferencias sexuales en la susceptibilidad a presentar crisis convulsivas durante el Síndrome de Abstinencia Diazepam.

Evidencias previas muestran que cualquier fenómeno epiléptico o evento que bloquee la actividad GABAérgica son capaces de favorecer la inducción de crisis convulsivas inducidas por PTZ (Vlainic y Pericic, 2009). El incremento de la excitabilidad neuronal cortical que caracteriza al SAD no modificó la susceptibilidad de crisis convulsivas inducidas farmacológicamente con PTZ en

ratas hembras Ovx (Fig. 19). En este caso la administración de E y P por separado o en secuencia tampoco ejercen una actividad individual en la inducción de convulsiones. Es necesario señalar dos puntos con respecto a este hallazgo 1) la dosis de PTZ utilizada para inducir crisis convulsiva fue supra-umbral (60mg/Kg). La latencia de la primer crisis convulsiva no se modificó durante el periodo de ansiedad del SAD, esto puede deberse a que la sensibilidad farmacológica del receptor GABA_A por la disminución hormonal endógena por efecto de la Ovx que puede producir un estado de mayor afinidad del receptor por el PTZ, esta huella farmacológica perdura y es la responsable de que todos los grupos Ovx aún tratados con hormonas no manifiesten alguna modificación en la inducción de crisis convulsivas). Es conocido el efecto de los E (Osborne y Frye, 2009) y la P en la protección de crisis convulsivas en roedores (Majewska y Rochelle, 1987) en la presente tesis la P tuvo efectos de incremento en la latencia de la primera crisis convulsiva inducida por PTZ. Es necesario hacer la acotación de que la dosis utilizada de P es suficiente para inducir la conducta sexual, reducir la ansiedad pero insuficiente para proteger de las crisis convulsivas. La dosis utilizada en este estudio fue de 0.1mg/Kg, en tanto que las dosis que han sido reportadas como protectoras de crisis convulsivas son de 50 a 75mg/Kg (Gholipour, 2008).

En el caso de los machos la inducción de crisis convulsivas por PTZ sí se incrementa cuando los animales tienen un síndrome de abstinencia (Fig. 20). La premisa de que la hiperexcitabilidad neuronal que acompaña a la abstinencia y favorece la aparición de crisis convulsivas es cierta en las ratas macho. En este caso la diferencia farmacológica de la susceptibilidad del desarrollo de crisis convulsivas por PTZ es evidente. Datos previos en ratones fortalecen este hallazgo, Pesce y cols identificaron que los ratones macho son más susceptibles de generar crisis convulsivas que las ratas hembra por una mayor sensibilidad a PTZ y Flumazenil evidenciando el papel modulador de la P en la neurotransmisión GABAérgica (Pesce et al, 1994). Queda de manifiesto que la actividad de la testosterona es menos eficiente que las hormonas sexuales en la hembra referente a la modulación alostérica del receptor GABA_A.

VII.IV Cambios en el EEG de las ratas hembra Ovx y macho antes, durante y después del tratamiento con Diazepam.

El tratamiento con Benzodiazepinas utilizado en forma breve es capaz de ser ansiolítico y sedativo. Sin embargo, cuando el tratamiento es crónico los efectos electroencefalográficos adversos pueden detectarse cuantitativamente. Estos datos de hiperexcitabilidad en la abstinencia en el EEG (espigas-onda, incremento en la amplitud y la frecuencia de la actividad frontal y parietal) se asocian con tolerancia y dependencia al fármaco. Datos previos han mostrado diferencias en el electroencefalograma entre machos y hembras de los efectos inducidos por la P, el Dz en animales gonadectomizados en diferentes edades (Fernández-Guasti et al, 2003; Corsi-Cabrea et al, 2007; Mele et al, 1984). Sin embargo, poco se ha estudiado del EEG durante las abstinencias a fármacos GABAérgicos, de ahí la importancia de los resultados de esta tesis.

Durante el estudio electroencefalográfico de la abstinencia a Dz se cuantificó que los machos tienen un incremento en la actividad del lóbulo parietal (Fig. 23 B), en contraste, las hembras presentan mayor activación en el lóbulo frontal (Fig. 22 A). En el estadio inicial de la abstinencia (primeras 24 h) aparecen los complejos espiga-onda, es de hacerse notar que cuantitativamente la excitabilidad es mayor para machos que para hembras (Fig. 21 C). Nuestros datos muestran que en contraste con el grupo de la Dra. Corsi-Cabrera, en los que ha reportado diferencias en el EEG durante la aplicación de Dz: los machos son más vulnerables a generar una actividad lenta y de gran amplitud en tanto que el grupo de las hembras no muestra este evento (Corsi-Cabrera et al, 2007). Estas diferencias son posibles que se deban a las distintas dosis de administración de la Benzodiazepina, en esta tesis se utilizó una dosis 20% mayor.

Por lo anterior, la discusión de esta tesis se enfocará en analizar los cambios durante la abstinencia y no durante la aplicación del Dz. La interrupción abrupta del Dz genera cambios inicialmente en la neurotransmisión GABAérgica y eventualmente en otras neurotransmisiones. El SAD se asemeja mucho en su inicio, manifestación EEG y clínica a otras abstinencias desarrolladas por fármacos GABAérgicos: alcohol y GABA (Schacht et al, 2011; Díaz, 2011; Calixto

et al, 2000; Casasola et al, 2004). Por lo que sugerimos que los mecanismos de inicio de la hiperexcitabilidad neuronal que se cuantifican en el EEG tienen similitudes en la etiopatogenia que desarrolla el SAD: 1) cambios presinápticos (Katsura, 2007) a) disminución, síntesis y liberación de GABA (Calixto, 2000), por cambios en la GAD (Salazar et al, 1994) y en el transportador de GABA (Kammereret al, 2011), b) Modificaciones en la conductancia de K^+ (Kammerer et al, 2011). 2) Modificaciones en la membrana postsináptica a) cambios en la sensibilidad y composición del receptor $GABA_A$ (Smith et al, 1998; 2007) b) disminución en la expresión de los receptores $GABA_A$ (Casasola et al, 2004) y c) Incremento de las corrientes de Ca^{2+} post-sinápticas (Ator et al, 2010; Katsura et al, 2007). Nuestra línea de investigación indica que desde el punto de vista temporal, primero ocurren los cambios GABAérgicos y eventualmente el de otras neurotransmisiones (Brailowsky, 1991; Calixto et al, 2000), esto implica que en los primeros estadios, el fenómeno sea altamente dependiente del fármaco (sólo la re-administración de la Benzodiacepina puede revertir los efectos de hiperexcitabilidad) y en consecuencia el fenómeno adquiere la tolerancia farmacológica que caracteriza a los síndromes de abstinencia. En resumen, incrementar o favorecer la actividad GABAérgica en forma crónica modifica la inhibición neuronal, este evento permite que se reduzca el efecto inhibitorio y favorece la excitación del tejido neuronal, lo cual es la fase de inicio de la abstinencia.

Para la fase de mantenimiento de la abstinencia, otras neurotransmisiones se involucran. Como ya se mencionó la neurotransmisión glutamatérgica, dopaminérgica, serotoninérgica y adrenérgica (Caputo y Bernardi, 2010; Uzun et al, 2010; Autier et al, 2009) participan en el mantenimiento asociado al incremento de la conductancia de Ca^{2+} postsináptico, por lo que se sugiere que los mecanismos de inicio y propagación de distintas vías neuronales se vean favorecidos para generar reverberancia que sobre-excite aún más la actividad neuronal por la caída del sistema GABAérgico.

La actividad EEG es la suma de la interacción de miles de poblaciones neuronales corticales, las cuales son excitadas por glutamato e inhibidas por el

GABA. Modificar el grado de excitabilidad cortical por alguno de estos dos agentes repercute en la excitación del SNC (crisis convulsivas o disminución de la actividad, respectivamente). La pérdida de este equilibrio es frecuente en los mamíferos y es uno de los factores por los cuales el cerebro de los humanos es vulnerable a las modificaciones sinápticas para adaptarse a diversos procesos externos (Gonzalez, 1998). Este equilibrio precisamente se pierde con la aplicación y la interrupción abrupta del Dz. Miles de poblaciones neuronales son inhibidas por la aplicación de la Benzodiacepina, de ahí radica que la actividad electroencefalográfica aumente su amplitud. La aplicación de Dz permite la sincronización, sin embargo, este proceso es el que modifica la neurotransmisión GABAérgica a mediano plazo (la aplicación i.p. durante 10 días es suficiente para dejar modificaciones sinápticas que empiezan a manifestarse por la interrupción de la aplicación del fármaco). En estas condiciones farmacológicas y fisiológicas, la organización biofísica y de conexión neuronal va haciendo que neurotransmisiones y moduladoras se involucren para generar un fenómeno que desde el punto de vista electrofisiológico, es el resultado de que cada vez más poblaciones neuronales se organicen en la sincronización de disparo, generando mayor hiperexcitabilidad y favoreciendo la liberación de neurotransmisores asociados al mantenimiento del SAD. Además, el proceso se continúa debido a que el filtro de la actividad de estructuras subcorticales se ve disminuido, por ejemplo: a) ritmos de frecuencia, b) circuitos de retroalimentación entre la corteza cerebral y los tálamos, c) la corteza cerebral y el hipocampo y d) corteza cerebral con ganglios basales, se modifica, esta disminución garantiza la aparición de información que normalmente no ingresa a la corteza cerebral, generando que estas aferencias sobre exciten a poblaciones neuronales corticales y sean uno de los elementos que favorecen la hiper-sincronía que se cuantifica en el EEG durante el SAD.

Los mecanismos biofísicos que modifican la fisiología neuronal repercuten a largo plazo a cambios anatómicos, que a su vez van favoreciendo más la excitabilidad neuronal (Vivash et al, 2011; Liu et al, 1999). Existen evidencias de reorganización del árbol dendrítico y cambios en la orientación y contracción del

axón cuando los sistemas de excitación y de inhibición se pierden (Liu et al, 1999). Semejante a lo que sucede en las epilepsias, en el SAD se perpetúan los cambios sinápticos y biofísicos: conexiones dendríticas y la aparición del *sprouting* (cambios en la morfología y la conexión del axón), esto es un proceso de plasticidad cerebral negativa que se ha asociado también a las adicciones.

Evidencias previas muestran que algunas abstinencias GABAérgicas son mayores en machos que en hembras (mayor susceptibilidad a presentar crisis convulsivas y dependencia a los fármacos que generó el cuadro de abstinencia, Pesce et al, 1994). Estos datos son acordes a los resultados de la presente tesis. Nuestros resultados muestran que las ratas macho tienen mayor hiperexcitabilidad en el estadio inicial de la abstinencia (mayor número de complejos espiga-onda), lo cual se asocia a una mayor vulnerabilidad de tener una crisis convulsiva. En contraste, el grupo de las hembras no tuvo una manifestación electrofisiológica tan fuerte de la abstinencia como los machos. Varias evidencias pueden sugerir la explicación del evento: 1) si bien en las hembras que fueron Ovx, antes de la gonadectomía, el cerebro estuvo modulado por una gran cantidad de esteroides sexuales, lo cual indica un mayor control GABAérgico (Plassart-Shiess y Baulieu, 2001; Baulieu et al, 2001). 2) La prueba del registro del primer estadio del SAD fue en presencia de P, la cual es un modulador alostérico positivo del receptor GABA_A, este esteroide puede reducir las manifestaciones electroencefalográficas del SAD (Majewska, 1992). 3) Evidencias recientes indican que la densidad de receptores GABA_A, su estructura (composición por subunidades) y sensibilidad farmacológica, tienen diferencia en el cerebro de ratas hembra con respecto a las ratas macho. Esto se explica por la modulación alostérica positiva del receptor además de la actividad genómica que tienen estas hormonas sobre la expresión de diversas enzimas como la GAD, el transportador de GABA y el control de la expresión de algunas subunidades del receptor GABA_A, todo lo anterior sugieren un dimorfismo sináptico: es posible que en el cerebro de las ratas hembras la actividad farmacológica GABAérgica sea más eficiente.

VIII. CONCLUSIONES

1. El SAD desencadena un estado de hiperexcitabilidad neuronal el cual incrementa la conducta sexual de la rata hembra Ovx pero no del macho.
2. La hiperexcitabilidad neuronal que caracteriza al SAD permite la aparición de la ansiedad en la rata.
3. Durante el SAD se modifica el umbral de desarrollar crisis convulsivas en las ratas macho pero no en las hembras.
4. El incremento de la actividad cortical inducido por el SAD favorece la aparición en el EEG de actividad epileptiforme, la cual en estadios iniciales es mayor en la rata macho que en la hembra.
5. Existen diferencias en las manifestaciones clínicas y electrofisiológicas del SAD entre machos y hembras.

IX. Referencias

- Academia Nacional de Medicina. (1999) Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ed. National Research Council. 1-84.
- Allison C, Pratt JA. (2006) Differential Effects of Two Chronic Diazepam treatment Regimes on Withdrawal Anxiety and AMPA Receptor Characteristics. *Neuropsychopharmacol* 31: 602–619.
- Allison C, Pratt JA, Ripley TL, Stephens DN. (2005) AMPA receptor autoradiography in mouse brain following single and repeated withdrawal from diazepam. *Eur J Neurosci* 21: 1045–1056.
- Alvarenga JM, Loyola F, Firmo JO, Lima-Costa MF, Uchoa E. (2007) Prevalence and sociodemographic characteristics associated with benzodiazepines use among community dwelling older adults: The Bambuí Health and Aging Study (BHAS). *Rev Bras Psiquiatr.* 31: 35-46.
- Anaya, G. (2008) Hiperexcitabilidad neuronal inducida por la abstinencia a Diazepam: Estudio electrofisiológico, farmacológico, y conductual. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Araki T, Kiyama H, Tohyama M. (1992a) The GABA_A receptor α 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Mol Brain Res* 15: 121-132.
- Araki T, Kiyama H, Tohyama M. (1992b) Region specific expression of GABA_A receptor α 3 and α 4 subunits mRNAs in the rat brain. *Mol Brain Res* 12: 293-314.
- Arenas MC, Puigcerver A. (2009) Diferencias entre hombres y mujeres en los trastornos de ansiedad: una aproximación psicobiológica. *Escritos de Psicología*, Vol. 3, 1: 20-29.

- Ator NA, Atack JR, Hargreaves RJ, Burns HD, Dawson GR. (2010) Reducing abuse liability of GABAA/benzodiazepine ligands via selective partial agonist efficacy at alpha1 and alpha2/3 subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 332(1):4-16.
- Authier N, Balayssac D, Sautereau M, Zangarelli A, Courty P, Somogyi AA, Vennat B, Llorca PM, Eschalier A. (2009) Benzodiazepine dependence: focus on withdrawal syndrome. *Ann Pharm Fr.* 67(6):408-13.
- Avoli M, Hwa G, Louvel I, Kurcewicz R, Pumain R, Lacaille JC. (1997) Functional and pharmacological properties of GABA mediated inhibition in the human neocortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 526-534.
- Baptista FL, Ferreira R, Cabral A, Moreno CV, Lira BM, Nobre MJ. (2007) Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Res* 1166.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. (2001) Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol.* 46: 1-32.
- Bazemore A, Elliott K, Florey E. (1956) Factor I and gamma-amino butyric acid. *Nature.* 178: 1052-1053.
- Bonnet U, Bingmann D. (1995) GABA_A-responses of CA3 neurons: contribution of bicarbonate and of Cl⁻-extrusion mechanisms. *Neuroreport* 6: 700-704.
- Borman J. (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *TINS* 11: 112-116.

- Bovolín P, Santi M, Memo M, Costa E, Grayson D. (1992) Distinct developmental patterns of expression of rat $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\gamma 2s$ and $\gamma 2l$ γ -amino butyric acid-a receptor subunit mRNAs *in vivo* and *in vitro*. J Neurochem 59: 62-72.
- Bowery N. (1990) GABA transporter protein cloned from rat brain. TIPS 11: 435-437
- Brailowsky S. (1991) The GABA-withdrawal syndrome. Proc West Pharmacol Soc 34: 227-228.
- Brailowsky S, Kunimoto M, Silva-Barrat C, Richie D, Naquet R. (1988) The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. Brain Res 442: 175-179.
- Brailowsky S, Menini C, Silva-Barrat C, Naquet R. (1987) Epileptogenic γ -amino butyric acid-withdrawal syndrome after chronic, intracortical infusion in baboons. Neurosci Lett 74: 75-80.
- Browning M, Bureau M, Dudek E, Olsen R. (1990) Protein kinase C and cAMP dependent protein kinase phosphorylate the α subunit of the purified γ -aminobutyric acid A receptor. PNAS 87: 1315-1318.
- Brown J, Wood M, Coldwell M, Briston D. (1998) γ -aminobutyric acid A receptor function is desensitized in rat cultured cerebellar granule cells following chronic flunitrazepam treatment. J Neurochem 71: 1232-1240.
- Buck K, Hahner L, Sikela J, Harris A. (1991) Chronic ethanol treatment alters brain levels of γ -amino butyric acid A receptor subunit mRNAs: relationship to genetic differences in ethanol withdrawal seizures severity. J Neurochem 57: 1452-1455.

- Bureau M, Laschet J. (1995) Endogenous phosphorylation of distinct gamma-amino butyric acid type A receptor polypeptides by Ser/Thr and Tyr kinase activities associated with the purified receptor. *J Biol Chem* 270: 26482-26487.
- Bureau M, Olsen R. (1990) Multiple distinct subunits of the γ -amino butyric acid-A receptor protein show different ligand-binding affinities. *Mol Pharm* 37: 497-502.
- Calixto E, López-Colomé AM, Casasola C, Montiel T, Bargas J. (2000) Neocortical hyperexcitability after GABA withdrawal in vitro. *Epilepsy Res* 39: 13-26.
- Casasola C, Montiel T, Calixto E, Brailowsky S. (2004) Hyperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neurosci* 126: 163-171.
- Cash D, Serfozo P, Allan A. (1997) Desensitization of a γ -aminobutyric acid type A receptor in rat is increased by chronic treatment with chlorodiazepoxide: a molecular mechanism of dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 704-711.
- Caputo F, Bernardi M. (2010) Medications acting on the GABA system in the treatment of alcoholic patients. *Curr Pharm Des.* 16 (19): 2118-25. Review
- Chebib M, Johnston G. (1999) The ABC of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 937-940.
- Churn S, DeLorenzo R. (1998) Modulation of GABAergic receptor binding by activation of calcium and calmodulin-dependent kinase II membrane phosphorylation. *Brain Res* 809: 68-76.

- Clark M. (1998) Sensitivity of the rat hippocampal GABA_A receptor α 4 subunit to electroshock seizures. *Neurosci Lett* 250: 17-20.
- Clark M, Massenburg G, Weiss R. (1994) Post analysis of the hippocampal GABA_A receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. *Mol Brain Res* 26: 309-319.
- Corsi-Cabrera M, del Río Portilla Y, Muñoz-Torres Z. (2007) sex-steroids dimorphic effects on functional brain organization: Differences in cognition, emotion and anxiety. *Psychoneuroendocrinology Research Trends*. 1-65.
- Costa E. (1987) Polytypic signaling at GABAergic synapses. *Life sciences* 42: 1407-1417.
- Covarrubias M, Tapia R. (1980) Brain glutamate decarboxylase: properties of its calcium-dependent binding to liposomes and kinetics of the bound and the free enzyme. *J Neurochem* 34: 1682-1688.
- Cox, Lebalnc, Marshan J. (1983) *Drugs and drugs abuse*. Addiction Research Foundation, Canada 432 pp.
- Curran-Rauhut MA y Petersen SL. (2002) Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase 65 and 67 gene expression by ovarian steroids; Identification of two functionally distinct populations of GABA neurons in the Preoptic Area. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 310-317.
- Depoortere H, Decober M, Honoré L. (1983) Drug effects on the various species of laboratory animals. *Neuropsychobiol* 9: 244-249.
- Deutch A, Roth R. (1999) Neurotransmitters. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond M, Bloom F, Landis S, Roberts J, Squire L, eds), California USA.

- Dhillon S, Oxley J, Richens A. (1982) Bioavailability Of Diazepam After Intravenous, Oral And Rectal Administration In Adult Epileptic Patients. *Br. J. Clin. Pharmacol* 13: 427-432.
- Diaz MR, Christian DT, Anderson NJ, McCool BA. (2011) Chronic ethanol and withdrawal differentially modulate lateral/basolateral amygdala paracapsular and local GABAergic synapses. *Pharmacol Exp Ther.* 337(1):162-70.
- Doble A, Martin I. (1996) The GABA_A/benzodiazepine receptor as a target for psychoactive drugs. In: *Neuroscience Intelligent Unit.* (Champan, Hill., eds). USA.
- Drexler B, Zinser S, Hentschke H, Antkowiak B. (2010) Diazepam decreases action potential firing of neocortical neurons via two distinct mechanisms. *Anesth Analg.* 111 (6): 1394-9
- Essrich C, Lorez M, Benson J, Fritschy J, Luscher N. (1998) Postsynaptic clustering of major GABA(A) receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nature-Neurosci* 1: 563-571.
- Feldman R, Meyer J, Quesner C. (1996) *Principles of Neuropsychopharmacology.* Academic Press, 485-500
- Fernández-Guasti A, del Río Portilla IY. (2003) Diazepam and progesterone produce sexually dimorphic actions on the EEG: role of the neonatal sexual differentiation process. *Psychoneuroendocrinology.* 28: 85-100.
- Fernández-Guasti A, Larsson K. and Beyer C. (1985) Effect of bicuculline on sexual activity in castrated male rats. *Physiology & Behavior.* 36: 235-237.

- Fernández-Guasti A, Larsson K. and Beyer C. (1986) Lordosis Behavior and GABAergic Neurotransmission. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 24: 673-676.
- Fernández-Guasti A, Picazo O. (1999) Sexual differentiation modifies the allopregnanolone anxiolytic actions in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 24: 251-267.
- Follesa P, Biggio F, Mancuso L, Cabras S, Caria S, Gorini G, Manca A, Orru A, Biggio G. (2004) Ethanol withdrawal-induced up-regulation of the alpha2 subunit of the GABA_A receptor and its prevention by diazepam or gamma-hydroxybutyric acid. *Brain Res Mol Brain Res* 120: 130-137.
- Follesa P, Cagetti E, Mancuso L, Biggio F, Manca A, Maciocco E, Massa F, Desole MS, Carta M, Busonero F. (2001) Increase in expression of the GABA_A receptor alpha4 subunit gene induced by withdrawal of, but not by long-term treatment with, benzodiazepine full or partial agonists. *Brain Res Mol Brain Res* 92:138–148.
- Follesa P, Mancuso L, Biggio F, Mostallino MC, Manca A, Mascia MP, Busonero F, Talani G, Sanna E, Biggio G. (2003) Gamma-hydroxybutyric acid and diazepam antagonize a rapid increase in GABA(A) receptors alpha(4) subunit mRNA abundance induced by ethanol withdrawal in cerebellar granule cells. *Molecular Pharmacology* 63: 896-907.
- Foster AC, Kemp JA. (2006) Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 6: 7-17.
- Frye C. (2001) The role of neurosteroids and non-genomic effects of progestins and androgens in mediating sexual receptivity of rodents. *Brain Research Reviews* 37: 201–222.

- Frye CA, Hirst JJ, Brunton PJ, Russell JA. (2011) Neurosteroids for a successful pregnancy. *Stress*. 14 (1): 1-5.
- Frye CA, Minerva G. (2009) Steroids, reproductive endocrine function, and cognition. A Review. 61 (6): 563-85. Review.
- Frye CA, Paris JJ. (2009) Infusions of bicuculline to the ventral tegmental area attenuates sexual, exploratory, and anti-anxiety behavior of proestrous rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 93 (4): 474-81.
- Frye CA, Paris JJ. (2010) Progesterone turnover to its 5 α -reduced metabolites in the ventral tegmental area of the midbrain is essential for initiating social and affective behavior and progesterone metabolism in female rats. *J Endocrinol Invest*. 640-652
- Frye C, Walf A. (2008) In ventral tegmental area, progestogens' membrane-mediated actions for lordosis of rats involve the second-messenger phospholipase C. *brain Research* 1230: 218-223.
- Frye C, Walf A, Petralia S. (2006) In the ventral tegmental area, progestins have actions at D1 receptors for lordosis of hamsters and rats that involve GABA_A receptors. *Hormones and Behavior* 50: 332 –337.
- Fritschy J, Benke D, Mertens S, Oertel H, Bachi T, Mohler H. (1992) Five subtypes of type A γ -amino butyric acid receptor identified in neurons by double and triple immunofluorescence staining with subunit-specific antibodies. *PNAS* 89: 6726-6730.
- Frosch M, Lipton S, Dichter M. (1992) Desensitization of GABA- active current and channels in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 12: 3042-3053.

- García-Ugalde G, Brailowsky S. (1993) Los receptores del GABA: de la electrofisiología a la biología molecular. *Ciencia* 44: 279-289.
- Gholipour T, Jabbarzadeh A, Riazi K, Rasouli A, Nezami BG, Sharifzadeh M, Dehpour AR. (2008) Role of nitric oxide in the anticonvulsive effect of progesterone. *Epilepsy Behav.* 13 (4): 579-84.
- Gil M, Bhatt R, Picotte KB, Hull EM. (2010) Oxytocin in the medial preoptic area facilitates male sexual behavior in the rat. *Horm Behav.* Dec 31.
- Gonzalez LP. (1998) Electrophysiological changes after repeated alcohol withdrawal. *Alcohol Health Res World.* 22 (1): 34-7.
- Goodman GA, Ruddon RW, Molinoff PB, Limbird LE, Hardman JG. (2007) *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* McGraw-Hill interamericana. Undécima edición.
- Greenblatt DJ, Shader, RI. (1978) Dependence tolerance, and addiction to benzodiazepines: clinical and pharmacokinetic considerations. *Drug Metab. Rev* 8, 13-28.
- Grover L, Lambert N, Schwartzkroin P, Teyler T. (1993) Role of HCO_3^- in depolarizing GABA_A receptor-mediated responses in pyramidal cells of rat hippocampus. *Neurophysiol* 69: 1541-1555.
- Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czysyk L, Keynan S, Miedel M, Davidson N, Lester H, Kanner B. (1990) Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303-1306.
- Hadingham K, Harkness P, McKernan R, Quirk K, Bourdelles B, Horne A, Kemp J, Barnard A, Ragan I, Whiting P. (1992) Stable expression of

mammalian type A γ -aminobutyric acid receptors in mouse cells: demonstration of functional assembly of benzodiazepine-responsive sites. PNAS 89: 6378-6392.

- Hevers W, Luddens H. (1998) The diversity of GABA_A receptors. Mol Neurobiol 18: 35-86.
- Hirouchi M, Ohkuma S, Kuriyama K. (1992) Muscimol-induced reduction of GABA_A receptor alpha 1-subunit mRNA in primary cultured cerebral cortical neurons. Brain Res Mol Brain Res 15: 327-331.
- Houser C, Vaughn J, Hendry S, Jones E, Peters A. (1984) GABA neurons in the cerebral cortex. Functional properties of cortical cells 2.
- Hull EM, Du J, Lorrain DS, Matuszewich L. (1997) Testosterone, Preoptic Dopamine, and Copulation in Male Rats. Brain Research Bulletin 44: No. 4, 327–333.
- Hull EM, Markowska VP. (1995) Cholecystokinin modulates mesolimbic dopaminergic influences on male rat copulatory behavior. Brain Research 699: 266-274.
- Impagnatiello F, Pesold C, Longone P, Caruncho H, Fritschy J, Costa E, Guidotti A. (1996) Modifications of γ -amino butyric acid A receptor subunit expression in rat neocortex during tolerance to diazepam. Mol Pharmacol 49: 822-831.
- Izzo E, Auta J, Impagnatiello F, Pesold C, Guidotti A, Costa E. (2001) Glutamic acid decarboxylase and glutamate receptor changes during tolerance and dependence to benzodiazepines. Proc Natl Acad Sci USA 98 (6): 3483-8.

- Johansen JA, Clemens LG, Nunez AA. (2008) Characterization of copulatory behavior in female mice: evidence for paced mating. *Physiol Behav.* 95 (3): 425-9.
- Jongsma ML, Van Rijn CM, Van Egmond J, Van Schaijk WJ, Sambeth A, Coenen AM. (2000) The influence of diazepam on the electroencephalogram-evoked potential interrelation in rats. *Neurosci Lett* 27; 293 (2): 83-6.
- Kammerer M, Rassner MP, Freiman TM, Feuerstein TJ. (2011) Effects of antiepileptic drugs on GABA release from rat and human neocortical synaptosomes. *NaunynSchmiedeberg's Arch Pharmacol.*
- Kardos J. (1999) Recent advances in GABA research. *Neurochem Int* 34: 353-358.
- Karlsson G, Pozza M, Olpe H. (1988) Phaclofen: a GABA_B blocker reduces long duration inhibition in the neocortex. *Eur J Pharmacol* 148: 485-486.
- Katsura M, Shibasaki M, Kurokawa K, Tsujimura A, Ohkuma S. (2007) Up-regulation of L-type high voltage-gated calcium channel subunits by sustained exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in cerebrocortical neurons. *J Neurochem.* 103 (6): 2518-28.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor J, Bishof S, Mickel S, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froesti W, Bettler B. (1997) Expression cloning of GABA_B receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239-246.
- Kerr D, Ong J, Prager R, Gynther B, Curtis D. (1987) Phaclofen: a peripheral and central baclofen antagonist. *Brain Res* 405: 150-154.

- Knapp R, Malatynska E, Yamamura H. (1990) From binding studies to the molecular biology of GABA receptors. *Neurochem Res* 15: 103-112.
- Komatsu Y. (1996) GABAB receptors, monoamine receptors, and postsynaptic inositol trisphosphate-induced Ca^{2+} release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J Neurosci* 6342-52.
- Krishek B, Xie X, Blackstone C, Huganir R, Moss S, Smart G. (1994) Regulation of GABA_A receptor function by protein kinase C phosphorylation. *Neuron* 12: 1081-1095.
- Krnjević K. (1984) Neurotransmitters in cerebral cortex: a general account. In: *Functional properties of cortical cells*. New York USA. Plenum.
- Krnjević K. (1991) Significance of GABA in brain function. In: *GABA mechanism in epilepsy* wiley-Liss, Inc. USA.
- Krnjević K. (1997) Role of GABA in cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 439-451.
- Kuffler S, Nichols J, Martin A. (1984) *From neuron of the brain*. Massachusetts. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Kuriyama K, Hirouchi M, Nakayasu H. (1993) Structure and function of cerebral GABA_A and GABA_B receptors. *Neurosci Res* 17: 91-99.
- Lader M. (1994) Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur Neuropsychopharmacol* 4: 81-95.

- Lader M, File S. (1987) The biological basis of benzodiazepine dependence. *Psychol Med* 17: 537-547.
- Lambert N, Harrison N. (1990) Analogs of cyclic AMP decrease γ -amino butyric acid a receptor mediated chloride current in cultured rat hippocampal neurons via an extracellular site. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 90-94.
- Langen B, Rundfeldt C. (2007) ELB139 an agonist at the benzodiazepine binding site increases 5-HT in the striatum and prefrontal cortex of rats: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav.* 86 (1): 79-85.
- Leidenheimer N, Chapell R. (1997) Effects of PKC activation and receptor desensitization on neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Mol Brain Res* 52: 173-181.
- Leidenheimer N, McQuilkin S, Hahner L, Whiting P, Harris A. (1992) Activation of protein kinase C selectively inhibits the γ -amino butyric acid A receptor: role of desensitization. *Mol Pharmacol* 41: 1116-1123.
- Levesque D, Gagnon S y Paolo T. (1989) Striatal D1 dopamine receptor density fluctuates during the rat estrous cycle. *Neuroscience Letters*, 98: 345-350
- Liu Q, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. (1992) A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *PNAS* 89: 6639-6643.
- Liu Z, Yang Y, Silveira DC, Sarkisian MR, Tandon P, Huang LT, Stafstrom CE, Holmes GL. (1999) Consequences of recurrent seizures during early brain development. *Neuroscience.* 92 (4): 1443-54.

- Llorente MD, David D, Golden AG, Silverman MA. (2000) Defining patterns of benzodiazepine use in older adults. *J Geriatric Psychiatry Neurol* 13 (3): 150-60.
- Lucio RA, Talchi-López JL. (2008) Análisis de la cópula y el Eyaculado de la rata Albina (*Rattus Norvegicus*). Manual de laboratorio. UAT, CONACYT, Tlaxcala, México.
- Luddens H, Korpi R, Seeburg H. (1995) GABA_A/benzodiazepine receptor heterogeneity: Neurophysiologic implications. *Neuropharmacol* 34: 245-254.
- Macdonald R, Olsen R. (1994) GABA_A receptor channels. *Ann Rev Neurosci* 17: 569-602.
- Majewska MD. (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol.* 38 (4): 379-95.
- Majewska MD and Rochelle, D. (1987) Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the γ -aminobutyric acid receptor complex in brain? *Brain Research*, 404: 355-360
- Manchikanti L, Brown K, Pharm, R, Singh V. (2002) National All Schedules Prescription Electronic Reporting Act (NASPER): Balancing Substance Abuse and Medical Necessity. *Pain Physician* 5 (3): 294-319.
- Mandema JW, Danhof M. (1992) Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinetic* 23 (3): 191-215.

- Mark L, Waltzman M. (1999) Flunitrazepam: A review of "roofies". *Ped Emer Care* 5: 59-60.
- Martin IL. (1987) The benzodiazepines and their receptors: 25 years of progress. *Neuropharmacol* 26: 957-970.
- Martín-García E, Darbra S, Pallarès M. (2007) Implicaciones de los neuroesteroides en la conducta normal y patológica. Revisión en *Neurociencias* 44; 661-676.
- Martínez-Mota L, Estrada-Camarena E, López-Rubalcava C, Contreras CM, Fernández-Guasti A. (2000) Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 25: 109-120.
- Mathey HG. (1965) Treatment of autonomic functional syndromes with 7-chloro-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one. *Arzneimittelforschung* 15 (4): 374-6.
- McKernan R, Whiting P. (1996) Which GABA_A receptors subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* 19: 139-143.
- McLellan A, O'Brien C, Metzger D, Alterman A, Cornish J, Urshel H. (1992) How effective is substance abuse treatment –compared to what? *Addictive states*. New York: Raven press. 231-252.
- Medina, Ma. ElenaBorges, Guilherme; Lara, Carmen; Benjet, Corina; Blanco, Jerónimo; Fleiz, Clara; Villatoro, Jorge; Rojas, Estela; Zambrano, Joaquín; Casanova, Leticia; Aguilar, Sergio. (2003). Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, agosto, 1-16

- Mehta A, Ticku M. (1999) An update on GABA_A receptors. *Brain Res Rev* 29: 196-217
- Mele L, Sagratella S, Massotti M. (1984) Chronic administration of diazepam to rats causes changes in EEG patterns and in coupling between GABA receptors and benzodiazepine sites in vitro. *Brain Research*. 323: 93-102.
- Mellerio F. (1980) Contribution of electroencephalography in tranquilizer withdrawal syndromes. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 10 (1): 95-103.
- Melis MR y Argiolas A. (1995) Dopamine and sexual behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 19, No. 1: 19-38
- Mhatre M, Ticku M. (1992) Chronic ethanol administration alters gamma butyric acid a receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 42: 415-422.
- Midel G. (1981) *Pharmacology*. USA: Englewood Cliffs.
- Minaya O, Ugalde O, Fresán A. (2009) Uso inapropiado de fármacos de prescripción: dependencia a benzodiazepinas en adultos mayores *Salud Mental*, 32; 5: 405-411.
- Misztal-Dethloff B, Stepień H, Komorowski J. (2005) Effect of diazepam and chlorpromazine on proliferative activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured endothelial HECa10 cells in vitro. *Pharmacol Rep* 57 (5): 670-4.
- Mohler H. (2006) GABA_A receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 731-740.

- Mohler H, Fritschy J. M, Rudolph U. (2002) A New Benzodiazepine Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (1): 2-8.
- Montiel T, Almeida D, Arango I, Calixto E, Casasola C, Brailowsky S. (2000) Long-lasting Effects of GABA infusion into the cerebral cortex of the rat. *Neural Plasticity*. 7, NOS 1-2: 1-8.
- Nelson H, Mandiyan S, Nelson N. (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS* 269: 181-184.
- Norbe M. N. et al. (2007) The blocked AMPA-kainate and NMDA receptors in the dorsal periaqueductal gray reduces the effects of diazepam withdrawal in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87: 250-257
- Nurse S, Lacaille J. (1997) Do GABA_A and GABA_B inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can J Physiol Pharmacol* 75: 520-525.
- O'Brien C. (1996) Addiction and abuse of substance. In: *The Pharmacological basis of therapeutics*. (Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman A, eds), 595-617.
- Ohmori Y, Kuriyama K. (1991) Pharmacological and biochemical characteristics of partially purified GABA_B receptor. *Neurochem Res* 16: 357-362.
- Olkkola KT, Ahonen J. (2008) Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol* 182: 335-60.
- Olsen R, Tobin A. (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB J* 4: 1469-1480.

- Osborne DM, Edinger K, Frye CA. (2009) Chronic administration of androgens with actions at estrogen receptor beta have anti-anxiety and cognitive-enhancing effects in male rats. *Age (Dordr)*. 31 (3): 191-8.
- Osborne DM, Frye CA. (2009) Estrogen increases latencies to seizures and levels of 5alpha-pregnan-3alpha-ol-20-one in hippocampus of wild-type, but not 5alpha-reductase knockout, mice. *Epilepsy Behav*. 16 (3): 411-4.
- Papadopoulos V. (1993) Peripheral-Type Benzodiazepine /Diazepam Binding Inhibitor Receptor: Biological Role in Steroidogenic Cell Function. *Endocrine Reviews* 14 (2): 222-240.
- Paul S. (1995) GABA and glycine. In: *Neuropharmacology: the fourth generation of progress* (Bloom F, Kupfer J, eds), New York, USA: Raven.
- Perkins K, Wong R. (1997) The depolarizing GABA response. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 516-519.
- Pesce ME, Acevedo X, Pinardi G, Miranda HE. (1994) Gender differences in Diazepam withdrawal síndrome in mice. *Pharmacology & Toxicology*. 75: 353-355.
- Pesold C, Caruncho J, Impagnatiello F, Berg M, Fritschy J, Guidotti A, Costa E. (1997) Tolerance to diazepam and changes in GABA receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neurosci* 79: 477-487.
- Petursson H, Lander M. (1984) *Dependence on tranquilliser*. Maudsley Monograph. Oxford University Press, Oxford 28.

- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101 (4): 815-50.
- Plassart-Schiess E, Baulieu EE. (2001) Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev.* 37 (1-3): 133-40.
- Puia G, Ducic I, Vicin S, Costa E. (1993) Does neurosteroid modulator efficacy depend on GABA_A receptors subunit composition? *Receptors and Channels* 1: 135-142.
- Purves D, Augustine G., Fitzpatrick D., Hall W., Lamantia AS, MacNamara J, Williams S. *Nuerociencias*, Ed. Panamericana. 3a Ed. México. 2006.
- Rada P, Hoebel BG. (2005) Acetylcholine in the accumbens is decreased by diazepam and increased by benzodiazepine withdrawal: a possible mechanism for dependency. *Eur J Pharmacol.* 508 (1-3): 131-8.
- Reddy DS, Jian K. (2010) The testosterone-derived neurosteroid androstenediol is a positive allosteric modulator of GABA_A receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1; 334 (3):1031-41.
- Ribeiro CS, Soares CA, Franco V, Botega N. (2007) Chronic use of diazepam in primary healthcare centers: user profile and usage pattern. *Sao Paulo Med J* 125 (5): 270-4.
- Robinson G, Setters E, Janecek E. (1981) Barbiturate and hypnosedative withdrawal by a multiple oral phenobarbital loading dose technique. *Clin Pharmacol Ther* 30: 71-76.

- Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (6): 801-10.
- Romano-Torres M, Borja-Lascurain E, Chao-Rebolledo C, del Río-Portilla Y, Corsi-Cabrera M. (2002) Effect of Diazepam on EEG power and coherent activity: sex differences. *Psychoneuroendocrinology* 27: 821-833.
- Ruano D, Cano J, Machado A, Vitorica V. (1991) Pharmacologic characterization of GABA_A/benzodiazepine receptor in rat hippocampus during aging. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 902-908.
- Salazar P, Montiel T, Brailowsky S, Tapia R. (1994) Decrease of glutamate decarboxylase activity after *in vivo* cortical infusion of γ -amino butyric acid. *Neurochem Int* 24: 363-368.
- Schacht JP, Randall PK, Waid LR, Baros AM, Latham PK, Wright TM, Myrick H, Anton RF. (2011) Neurocognitive Performance, Alcohol Withdrawal, and Effects of a Combination of Flumazenil and Gabapentin in Alcohol Dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 530-554.
- Shader RI, Greenblatt DJ. (1981) The Use of Benzodiazepines In Clinical Practice. *Br. J. Clin. Pharmacol* 11, 5S-9.
- Shen G, Tietz EI. (2011) Down-regulation of synaptic GluN2B subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors: a physiological brake on CA1 neuron α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid hyperexcitability during benzodiazepine withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther.* 336 (1): 265-73.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoger H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABA_A receptors. *Neurochem Int* 34: 379-385

- Silva-Barrat C, Champagnat J, Brailowsky S, Menini C y Naquet R. (1989). Relationship between tolerance to GABA_A agonist and bursting properties in neocortical neurons during GABA-withdrawal syndrome. *Brain Research*, 498: 289-298.
- Smith RL. y Barrett RJ. (1996) Tolerance to the anticonflict effects of Diazepam: Importace of methodological considerations. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol 58, 1: 61-68.
- Smith SS, Gong Q, Li X, Moran M, Bitran D, Frye C, Hsu F. (1998) Withdrawal from 3 α -OH-5 α -pregnan-20-one using a pseudo pregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA_A -gated current and increases the GABA_A receptor α 4 subunit it association with increased anxiety. *J Neuroscience*, 18: 5275-5284.
- Smith SS, Shen H, Gong QH, Zhou X. (2007) Neurosteroid regulation of GABA_A receptors: Focus on the α 4 and δ subunits. *Pharmacology & Therapeutics* 116: 58 –76
- Soltesz I, Haby M, Leresche N, Crunelli V. (1988) The GABA_B antagonist phaclofen inhibits the late K⁺ dependent IPSP in cat and rat thalamic and hippocampal neurons. *Brain Res* 448: 351-354.
- Song J, Shen G, Greenfield LJ Jr, Tietz EI. (2007) Benzodiazepine withdrawal-induced glutamatergic plasticity involves up-regulation of GluR1-containing α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in Hippocampal CA1 neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 322 (2): 569-81.

- Souza, S et al. (2008) Intranasal administration of progesterone increases of dopaminergic activity in amígdala and neostriatum of malre rats. *Neuroscience* 157: 196-203.
- Squires RF. (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacol* 22: 1443-1450.
- Staley K, Proctor W. (1999) Modulation of mammalian dendritic GABA(A) receptor function by the kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. *J Physiol (Lond)* 519: 693-712.
- Staley K, Soldo B, Proctor W. (1995) Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science* 269: 977-981.
- Stelzer A, Kay A, Wong S. (1988) GABA_A receptor functional in hippocampal cells is maintained by phosphorylation factors. *Science* 241: 339-341.
- Steppuhn KG, Turski L. (1993) Diazepam dependence prevented by glutamate antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90 (14): 6889-93.
- Sternbach LH (1979) The benzodiazepine story. *J Med Chem* 22 (1):1-7.
- Stoffel-Wagner B, Watzka M, Steckelbroeck S, Ludwig M, Clusmann H, Bidlingmaier F, Casarosa E, Luisi S, Elger CE, Beyenburg S. (2003) Allopregnanolone serums and expression of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in hippocampal and temporal cortex of patients with epilepsy. *Epilepsy Research* 54: 11-19.

- Suzuki T, Shimizu N, Tsuda M, Soma M, Misawa M. (1999) Role of metabotropic glutamate receptors in the hypersusceptibility to pentylenetetrazole-induced seizure during diazepam withdrawal. *European Journal of Pharmacology*. 369: 163-168.
- Tapia R, Sandoval M. (1971) Study of inhibition of brain of glutamate descarboxilase by pyridoxal phosphatexime -O-acetic acid. *J Neurochem* 18: 2051-2059.
- Tapia R, Sandoval M, Contreras P. (1975) Evidence for a role of glutamate descarboxilase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *J Neurochem* 12: 1283-1285
- Tareilus E, Schoch J, Breer H. (1994) GABAB-receptor-mediated inhibition of calcium signals in isolated nerve terminals. *Neurochem Int*.
- Teuber L, Watjens F, Jensen L. (1999) Ligands for the benzodiazepine binding site-a survey. *Curr Pharm Des* 5: 317-343.
- Thompson C, Bodewits G, Stephenson A, Turner J. (1992) Mapping of GABA_A receptor $\alpha 5$ and $\alpha 6$ subunit like immunoreactivity in rat brain. *Neurosci Letters* 144: 53-56
- Thompson S, Gahwiler B. (1992) Comparison of the actions of baclofen at pre and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol* 451: 329-345.
- Tzunashima K, Schwarzer C, Kichmair E, Sieghart W, Sperk G. (1997) GABA_A receptor subunit in the rat hippocampus III. Altered messenger RNA expression in kainic acid -induced epilepsy. *Neurosci* 80: 1019-1032.

- Uusi-Oukari M. y Korpi ER. (2010) Regulation of GABA_A receptor subunit expression by Pharmacological agents. *Pharmacological Rev.* 62:97-135.
- Uzun S, Kozumplik O, Jakovljević M, Sedić B. (2010) Side effects of treatment with benzodiazepines. *Psychiatr Danub.* 22 (1): 90-3.
- Van Sickle BJ, Xiang K, Tietz EI. (2004) Transient plasticity of hippocampal CA1 neuron glutamate receptors contributes to benzodiazepine withdrawal-anxiety. *Neuropsychopharmacol* 29 (11): 1994-2006.
- Vicens C, Fiol F, Llobera J, Campoamor F, Mateu C, Alegret S, Socías I. (2006) Withdrawal from long-term benzodiazepine use: randomized trial in family practice. *British Journal of General Practice* 56: 958–963.
- Vivash L, Tostevin A, Liu DS, Dalic L, Dedeurwaerdere S, Hicks RJ, Williams DA, Myers DE, O'Brien TJ. (2011) Changes in hippocampal GABA_A/cBZR density during limbic epileptogenesis: relationship to cell loss and mossy fibre sprouting. 41 (2): 227-36
- Vlainic, J, Pericic D. (2009) Effects of acute and repeated zolpidem treatment on pentylenetetrazole-induced seizure threshold and on locomotor activity: Comparison with diazepam. *Neuropharmacology.* 56: 1124-1130.
- Wafford KA, Bain CJ, Quirk K, McKernan RM, Wingrove PB, Whiting PJ, Kemp JA. (1994) A novel allosteric modulatory site on the GABA_A receptor beta subunit. *Neuron* 12: 775-782.
- Walf AA, Frye CA. (2010) Estradiol reduces anxiety- and depression-like behavior of aged female mice. *Physiol Behav.* 99 (2): 169-74.

- Walker, DW, y Zornetzer, SF. (1974) Alcohol withdrawal in mice: Electroencephalographic and behavioral correlates. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 36: 233–243.
- Wang J, Kofuji P, Burt D. (1992) Strain comparisons and developmental profile of the delta subunit of the murine GABA_A receptor. *Brain Res Bull* 29: 119-123.
- Wilcox A, Warrington J, Gardiner K, Berger R, Whiting P, Altherr M, Wasmuth J, Patterson D, Sikela J. (1992) Human chromosomal localization of genes encoding the γ 1 and γ 2 subunits of the γ -amino butyric acid receptor indicates that members of this gene family are often clustered in the genome. *PNAS* 89: 5857-5861.
- Wittchen HU, Zhao S, Kessler RC, Eaton WW. (1994) DSM-III—R generalized anxiety disorder in the National Comorbidity Survey. *Archives of General Psychiatry*. 51 (5): 355-364.
- Woods JH, Winger G. (1997) Abuse of Flunitrazepam. *J of clin Psychopharmacol* 17: 1S-57S.
- World Health Organization. (2003) Who Expert Committee on Drug Dependence. Thirty-third Report.
- Wu J, Chang Y, Li G, Xue F, Dechon J, Elisworth K, Liu Q, Yang K, Bahadroani N, Zheng C, Zhang J, Rekate H, Rho JM, Kerrigan JF. (2007) Electrophysiological properties and subunit composition of GABA_A receptors in patients with gelastic seizures and hypothalamic hamartoma. *J Neurophysiol* 98: 5-15.

- Xiang K, Tietz EI. (2007) Benzodiazepine-induced hippocampal CA1 neuron alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionic acid (AMPA) receptor plasticity linked to severity of withdrawal anxiety: differential role of voltage-gated calcium channels and N-methyl-D-aspartic acid receptors. *Behav Pharmacol* 18 (5-6): 447-60
- Zhai J, Stewart R, Friedberg M, Li C. (1998) Phosphorylation of the GABA (A) receptor gamma 2L subunit in rat sensory neurons may not be necessary for ethanol sensitivity. *Brain Res* 805: 116-122.
- Zhang J, Sato M, Tohyama M. (1992) Co expression of the α 1 and β 2 subunit genes of the GABA_A receptor in the magnocellular preoptic nucleus. *Mol Brain Res* 15: 171-173.
- Zheng P. (2009) Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology* 89: 134–152.