



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Facultad de Psicología

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA SEXUAL, DE
ANSIEDAD Y DE DEPRESIÓN DURANTE EL SINDROME
DE ABSTINENCIA A GABA EN LA RATA MACHO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ANA KAREN PIMENTEL FARFÁN

DIRECTOR:

DR. EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

MEXICO, D.F. 2013





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Esta tesis fue realizada en el
Departamento de Neurobiología de la
División de Investigaciones en Neurociencias del
Instituto Nacional de Psiquiatría
“Ramón de la Fuente”

Tesis apoyada por el proyecto
Igualdad entre Mujeres y Hombres 2013
Dirección General de Investigaciones en Neurociencias
INPRF



Tesis apoyada por la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de
Salud y Hospitales de Alta Especialidad
Beca PROBEI



Tesis apoyada por el CONACyT
(Proyecto: 166823)

MUCHAS GRACIAS

Agradecimientos

Quiero dedicar y compartir este gran logro con mi familia:

Hilda Pimentel Farfán, Álvaro Castillo Pimentel
y Abraham Castillo Pimentel

por el apoyo que me han brindado y por confiar en mí.

A mis tías y tíos, por las charlas, los consejos, los chistes; todas y todos son parte de mí. A mi abuelita Adelaida Farfán Molina, por que siempre me ha apoyado y tiene unos minutos para escucharme.

A mi tutor Eduardo Calixto, por brindarme un espacio en tu laboratorio y por el conocimiento que me has transmitido, por lo que has compartido conmigo, muchas gracias.

A José María, por ser parte de este momento tan importante para mí. A todas las personas que conocí en el laboratorio Isaac, Rosendo, Mariana, Karla, Ever, Paty, Karina, Eugenia y Pablo, todas y todos fueron parte de mi formación en la ciencia, en especial a Alejandra Hernández González gracias por tu apoyo, por tu tiempo y por todos esos momentos juntas en el laboratorio, definitivamente inolvidables.

A Paola Aguirre Fuentes, José Manuel Cabrera Linares y Alberto Zamudio Bernal por que sé que: el tiempo pasa y nos vemos poniendo viejos, pero siempre están ahí. A las amigas y los amigos que conocí en la Facultad de Psicología, por esos momentos gratos que son parte de mí.

Índice

Lista de abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Introducción.....	9
I. Antecedentes	
1. Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central.....	10
1.1. Ácido γ - aminobutírico GABA	10
1.2. Síntesis y metabolismo del GABA	11
1.3. Recaptura del GABA	12
1.4. Receptores ionotrópicos: GABA _A y GABA _C	13
1.5. Receptor metabotrópico: GABA _B	14
1.6. Fisiología del sistema GABAérgico	16
1.7. Sustancias que Modulan al Receptor GABA _A	17
1.8. Alteraciones del Sistema GABAérgico	17
2. Adicción, Tolerancia y Dependencia	18
2.1 Síndrome de Abstinencia a GABA	21
3. Modulación GABAérgica de la Conducta.....	26
3.1 Hormonas Esteroides Sexuales	26
3.2 Neuroesteroides	27
3.3 Conducta Sexual	29
3.4 Etapas de la cópula de la Rata.....	32
3.5 Patrones Conductuales Copulatorios	33
3.6 Ansiedad y Depresión	35
II. Justificación	38

III. Planteamiento del Problema	39
IV. Objetivos	40
Variables de trabajo	41
Hipótesis	42
V. Material y Método	43
Entrenamiento para ratas sexualmente expertas.....	44
Gonadectomía Machos	45
Cirugía Estereotáxica.....	46
Aparatos e Instrumentos	46
Registro EEG	46
Laberinto Elevado en Cruz para Evaluar Ansiedad	47
Evaluación de la Conducta Sexual de la Rata Macho.....	47
Nado Forzado para Evaluar Conducta Depresiva.....	48
Procedimiento experimental	48
Análisis estadístico.....	50
VI. Resultados	53
VII. Discusión	72
VIII. Conclusiones	87
IX. Referencias	88

Lista de Abreviaturas

α - KG	α - cetoglutarato
2-DG	2-desoxiglucosa
5-HT	Serotonina
Ach	Acetilcololina
Bz	Benzodicepina
Bic	Bicuculina
Ca ²⁺	Ión calcio
Cl ⁻	Ión cloro
CS	Conducta sexual
Cx	Corteza
DA	Dopamina
DAVA	Ácido δ - aminovalérico
DHT	5 α -dihidrotrestosterona
Dz	Diazepam
E ₂	Estradiol
EEG	Electroencefalograma
GABA _A	Receptor ionotrópico a GABA
GABA _B	Receptor metabotrópico GABA
GABA-T	GABA <i>transaminasa</i>
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GDX	Gonadectomizados
h	Hora
HHA	Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal
HHG	Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal
Hz	Hertzio (ciclo por segundo)
i.p.	Intraperitoneal
IPSP	Potenciales Posinápticos Inhibitorios
K ⁺	Ion potasio
LEC	Laberinto Elevado en Cruz
Na ⁺	Ion sodio
NAc	Núcleo accumbens
NE	Norepinefrina

NF	Nado forzado
P ₄	Progesterona
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Fosfato de Piridoxal (vitamina B ₆)
POA	Área Preóptica Medial
Proteínas G	Proteínas de asociadas a nucleótidos de guanina
SAG	Síndrome de Abstinencia a GABA
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Semialdehído succínico
T	Testosterona
THIP	Tetrahidroisozalozolo
VMH	Núcleo Ventromedial del Hipotálamo
VTA	Área Tegmental Ventral
5 α -R	5 α -reductasa
3-HSOR	3-hidroxiesteroide oxidoreductasa
AloP	Alopregnanolona
OVX	Ovarectomizadas
THDOC	5 α -dihidrodeoxicorticosterona
ISSR	Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente
mg	miligramos
ml	mililitros
μ g	microgramos
i.p.	Intraperitoneal
mm	milímetros

Resumen

El tratamiento prolongado con drogas GABAérgicas genera estados de tolerancia y dependencia; su retiro abrupto puede traer como consecuencia estados ansiedad y depresión, situación que se manifiesta frecuentemente en la clínica.

En este contexto, el Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG) es un modelo experimental que genera actividad epileptiforme debido al retiro súbito de la instilación intracortical de GABA; reduce la liberación y la síntesis de GABA así como el número de los receptores GABA_A. Dada la abundancia de la neurotransmisión GABAérgica puede estar modulando cualquier función y conducta nos preguntamos: ¿el SAG tiene un impacto en la aparición o mantenimiento de conducta la sexual, de la ansiedad y de depresión? ¿Las hormonas sexuales masculinas (testosterona y sus metabolitos) tienen un impacto en la expresión del SAG ó en las conductas de ansiedad y depresión?

Para esto se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar sexualmente expertas y gonadectomizadas (GDX), encontramos que el SAG en la rata macho GDX manifiesta mayor potencia en el EEG, pero no hay diferencias en la latencia (~15 min), esta condición en su fase temprana se acompaña de un estado de ansiedad, sin presencia de un perfil depresivo en ambos grupos; con un incremento en la duración de la serie copulatoria en las ratas sexualmente expertas. El efecto del SAG en ratas macho intactas se reduce paulatinamente hasta regresar a la actividad basal 9 días después de la instilación.

El SAG es un fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal reversible, induce un efecto negativo en la conducta sexual. La ausencia de hormonas gonadales hace más susceptible a la corteza cerebral a la abstinencia, sin modificar la expresión de ansiedad y sin inducir una conducta depresiva.

Introducción

La neurotransmisión GABAérgica es la más abundante en el sistema nervioso central (SNC) y representa el principal control inhibitorio en los mamíferos. Siete de cada diez neuronas en la corteza neuronal utilizan a este aminoácido para la comunicación química, en este contexto podemos sugerir que el GABA está implicado en la modulación en la gran mayoría de las funciones y conductas debido a su gran distribución.

El Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG) es un modelo experimental de tolerancia y dependencia a un neurotransmisor validado y reproducible, el cual es una analogía de la abstinencia generada por otras drogas que modulan en forma alostéricamente positiva al receptor GABA_A, este síndrome es generado a través de la interrupción abrupta de la infusión intracortical de GABA, produciendo sincronización y descarga neuronal de la zona instilada, el cual se exhibe en el EEG con la presencia de complejos espiga-onda y trenes de descargas de alta frecuencia.

Tras la modificación de la concentración de GABA en una zona específica de la corteza cerebral, se generan cambios en la comunicación celular y esto a su vez, es capaz de impactar la sincronización de disparo neuronal, no solo en el área instilada, sino también en estructuras subcorticales, como el tálamo.

La actividad del hipocampo, el tálamo y la amígdala son modificadas durante el SAG, estos núcleos involucran la expresión de la depresión y la conducta sexual. Asimismo; la ansiedad, es fundamentalmente modulada por los receptores GABA_A, en este sentido el SAG puede impactar en la expresión de ansiedad, de depresión y de conducta sexual.

I. Antecedentes

1. Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central

1.1 Ácido γ -aminobutírico GABA

El ácido γ -aminobutírico mejor conocido como GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos, en los años 50's se descubrió que esta sustancia no sólo se encontraba en el cerebro, sino que este era el órgano que más GABA contenía (Olsen, 2000; Murray et al., 2001; Cortés-Romero et al., 2011).

La primera evidencia de que el GABA actuaba como un transmisor inhibitorio fue en 1967, cuando Krnjević y Schwartz (en Olsen, 2000) compararon las propiedades de los potenciales posinápticos inhibitorios (IPSP) y demostraron que su acción es hiperpolarizar a la neurona postsináptica, es decir, disminuyen la probabilidad de la neurona para generar un potencial de acción; este efecto se da gracias a que el GABA al unirse con su receptor ionotrópico GABA_A aumenta la corriente entrante de Cl⁻ y el interior de la célula se vuelve más negativo, disminuyendo así la excitabilidad (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988).

Las neuronas GABAérgicas tienen una distribución amplia y difusa en el cerebro, de esta forma se sabe que actúan como interneuronas, sin embargo, existe vías GABAérgicas como la vía estriadonigral y la vía cerebelo-vestibular. Este neurotransmisor es muy importante debido a que su papel es controlar la excitabilidad y el disparo neuronal (Bormann, 1988), dada su amplia distribución en el SNC de los mamíferos, está ligado al control y regulación de varias conductas.

1.2 Síntesis y metabolismo del GABA

El GABA es sintetizado a partir del neurotransmisor más común en el SNC cuyas propiedades son paradójicamente excitatorias: el ácido glutámico, que es producto de la desaminación de la glutamina o como metabolito intermediario de la oxidación de la glucosa (Figura 1; Foster y Kemp, 2006; Murray et al., 2001; Olsen, 2000; Kandel et al., 2001).

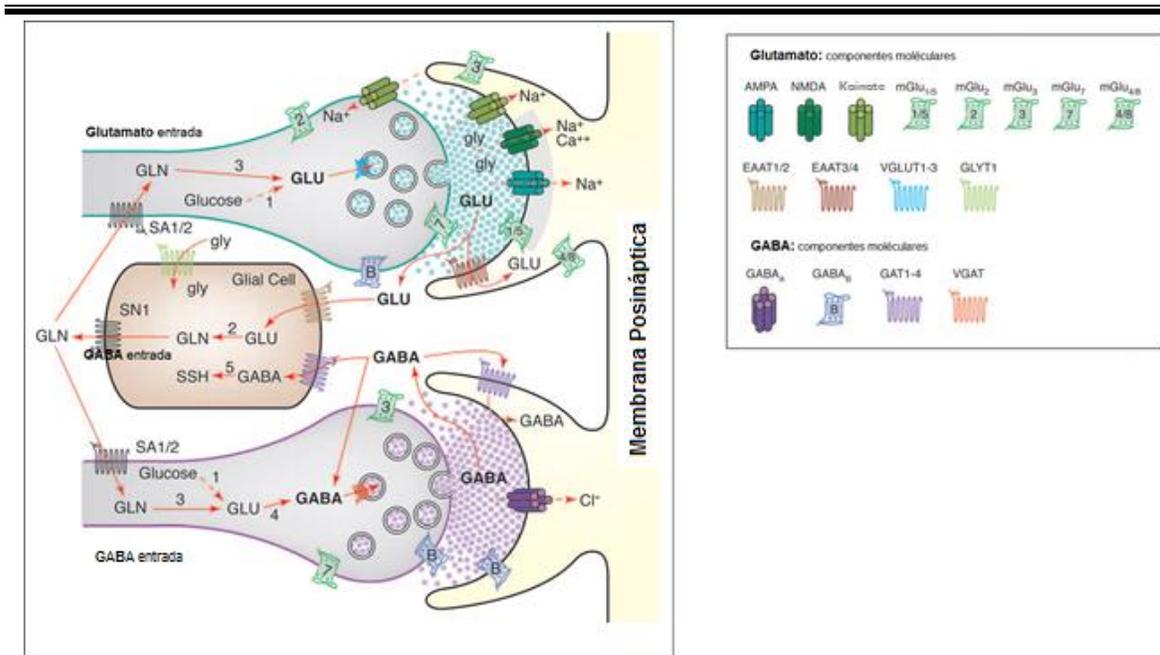


Figura 1. Representación bioquímica y fisiológica de las dos neurotransmisiones más importantes en el SNC. Abajo, la dependiente del GABA. La glutamina (GLN) es capturada por la glía (al centro) por medio de su transportador específico (SN1) o en la terminal pre-sináptica por el SA1/2. La GLN es desaminada por la enzima glutaminasa para convertirse en glutamato (GLU, paso 3). El GLU también puede ser un metabolito intermedio de la oxidación de la glucosa (transaminación del α -cetoglutarato, paso 1). El GLU se transforma en GABA por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, paso 4). El GABA puede interactuar con sus receptores pre y post-sinápticos y/o ser capturado por un transportador glial (GAT1-4) o neuronal. El GABA es catabolizado por la enzima succinato deshidrogenasa en succinato semialdehído (SSH; paso 5). El efecto de ésta neurotransmisión es inducir una disminución de la actividad neuronal. En contraste, arriba 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. A la derecha, se muestran los receptores de GLU y de GABA (Tomado y modificado de: Foster y Kemp, 2006).

Para formar el GABA, el ácido glutámico es descarboxilado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), también conocida como L-glutamato-1-carboxilasa-liasa, que elimina un grupo carboxilo y necesita la presencia de

vitamina B₆ (fosfato de piridoxal; PLP) para su óptimo funcionamiento (Herrera, 1986).

La mayoría del glutamato y del GABA que son usados como neurotransmisores son derivados de la pozas de glutamina que se encuentran en las células gliales (Olsen, 2000), utilizan al α -cetoglutarato (α -KG) para reducirlo a semialdehído succínico (SSA) y a glutamato, esta reacción es catalizada por la enzima GABA *transaminasa* (GABA-T) también dependiente de PLP. Un aspecto interesante es que la enzima que produce a su sustrato (ácido glutámico) también lo degrada, es decir, que la GABA-T es la clave de la síntesis y del catabolismo del GABA (Figura 1, Foster y Kemp, 2006; Murray et al, 2001; Paul, 1995; Herrera, 1986).

La GAD es fundamental para el control de la excitabilidad neuronal, ya que la disminución de su actividad favorece la aparición de crisis convulsivas (Tapia et al., 1975). La GAD está presente en las neurona en dos formas, es codificada por dos genes distintos y se conocen como GAD65 y GAD67 difieren en su distribución, una de ellas es encontrada en las terminales nerviosas y la otra en las mitocondrias de las células gliales, así como en la afinidad con el cofactor PLP, teniendo la primera mucha afinidad, con actividad rápida y regulada eficientemente, mientras que la segunda posee una débil interacción con el cofactor y es regulada a nivel de la transcripción, así que su actividad depende de la excitabilidad neuronal (Paul, 1995; Herrera, 1986; Tapia y Sandoval, 1971).

1.3 Recaptura del GABA

El sistema de recaptura tiene como función principal remover el GABA del espacio sináptico después de ser liberado como parte fundamental del proceso de transmisión sináptica, este mecanismo es primordial para la inactivación de su efecto. Tanto las neuronas como las células gliales están encargadas de la recaptura de GABA (Figura 1, Foster y Kemp, 2006; Olsen, 2000). La activación de los transportadores en las terminales nerviosas depende del

gradiente electroquímico del Na^+ , por lo que es dependiente de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ (Olsen, 2000).

El transportador de GABA es una proteína de doce pasos transmembranales se han identificado 4 tipos (GAT 1-4); los transportadores GAT 1 y 4 son los más abundantes en el SNC de los mamíferos y están localizados principalmente en las terminaciones nerviosas. El tipo GAT-2 es abundante en la glía y el GAT-3 está altamente expresado en las leptomeninges y en el plexo coroideo. El transportador de GABA tiene diferentes 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).

1.4 Receptores ionotrópicos: GABA_A y GABA_C

El receptor GABA_A es el sitio de acción de numerosos fármacos con propiedades ansiolíticas (benzodiazepinas; Bz), anticonvulsivantes, músculo relajantes y sedativas (barbitúricos). Debido a su estructura es parte de una superfamilia de canales iónicos activados por ligando, la cual incluye al receptor para acetilcolina (ACh; nicotínico), para glutamato, para glicina, para serotonina (5-HT_3), entre otros (Olsen, 2000, Cortés- Romero et al., 2011).

El receptor GABA_A está compuesto por 5 subunidades distintas que al ensamblarse forman un canal específico para Cl^- o HCO_3^- (ver Figura 2); puede formarse por la interacción de 16 subunidades: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , π , θ (Cortés- Romero et al., 2011; Parker et al., 2006; Olsen, 2000). La mayoría de los receptores GABA_A están compuestos por las subunidades $\alpha\beta\gamma$, (en estequiometría 2:2:1 respectivamente), aunque la isoforma más abundante es la $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Los patrones de expresión de subunidades y sus combinaciones pueden variar la sensibilidad farmacológica, asimismo las isoformas que se expresan dependen de la zona del cerebro (ver tabla 1).

El sitio de pegado del GABA se encuentra entre la subunidad α y β ; este sitio reconocido por análogos estructurales del GABA como el mucimol, la isoguvacina, el THIP (tetrahidroisozalozolo) y DAVA (ácido δ - aminovalérico). Esas sustancias activan la apertura del canal con conductancia similar pero diferentes tiempos de vida media, comparados con el GABA, en cambio, la bicuculina (Bic), antagonista competitivo, bloquea las corrientes inducidas por el GABA eliminando la activación del canal de Cl^- (Herrera, 1986).

Los receptores ionotrópicos que contienen a las subunidades rho (ρ 1-3) son conocidos como GABA_C , sólo han sido encontrados en la retina y poseen propiedades farmacológicas distintas a las del receptor GABA_A , es decir, que no son sensibles a la Bic, al baclofén, ni a otras drogas afines al receptor GABA_A como los anestésicos y las Bz (Cortés-Romero et al., 2011).

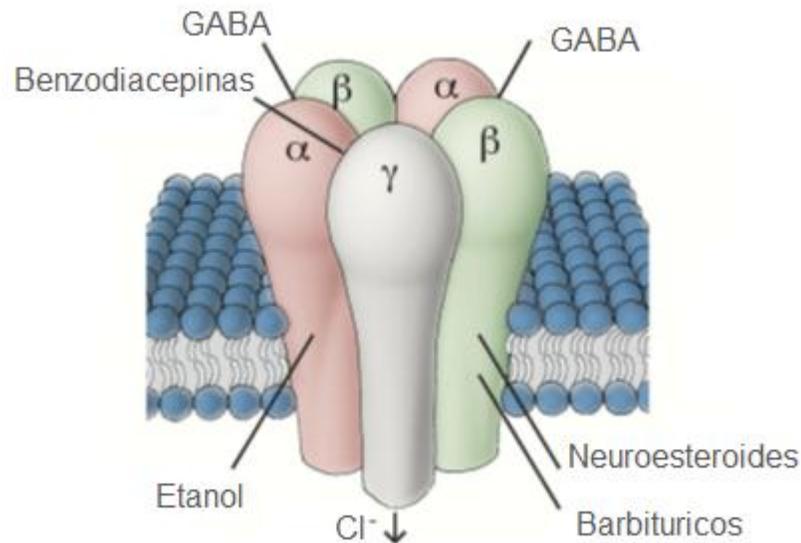


Figura 2. Esquema del receptor GABA_A y los sitios de unión. El receptor GABA_A es un hetero-pentámero que en su forma más común contiene dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ ; contienen sitios de unión para varias moléculas, como las benzodiazepinas, el etanol, los neuroesteroides, los barbitúricos y el GABA cuyo sitio de unión es entre las subunidades α y β . (Imagen tomada y modificada de Uussi-Okari y Korpi, 2010).

1.5 Receptor metabotrópico: GABA_B

El receptor GABA_B se clasifica como receptor metabotrópico por que tiene una acción lenta y prolongada. Se encuentra principalmente en la membrana

presináptica, ahí actúan como autoreceptor, inhibiendo la liberación de GABA; puede jugar el mismo papel en neuronas que liberan otros neurotransmisores (hetero-receptores). Este receptor está asociado con canales iónicos sensibles de Ca^{2+} o K^+ involucrando la activación segundos mensajeros.

Los receptores $GABA_B$ se componen de la subunidad $GABA_{B1}$ y $GABA_{B2}$. A nivel postsináptico, estos receptores se expresan en neuronas GABAérgicas o no GABAérgicas restableciendo el potencial de membrana en reposo. Debido a la estructura de este receptor no es capaz de reconocer a la Bic, la isoguvacina y el THIP, en caso contrario, es activado por el baclofén (Filip y Frankowska, 2008).

Tabla1 Ubicación de isoformas y distribución del receptor $GABA_A$	
Isoformas $GABA_A$	Distribución en el SNC
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Capa granular del bulbo olfatorio, capa de células polimorfas y región CA3 del hipocampo, interneuronas corticales, globo pálido y varios núcleos subtalámicos.
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	Bulbo accesorio olfatorio, el estriado, el septum, la capa molecular del giro dentado e hipocampo.
$\alpha_2\beta\gamma_1$	Es posible y se sugiere que se exprese en la glía de Bergmann y en núcleos del sistema límbico.
$\alpha_3\beta\gamma_2$	Células monoaminérgicas de varios núcleos cerebrales.
$\alpha_3\theta\epsilon$	Locus coeruleus de la rata.
$\alpha_4\beta\gamma_2$	Tálamo, caudado, putamen y giro dentado.
$\alpha_4\beta_2\delta$	Núcleos talámicos y la corteza cerebral.
$\alpha_4\beta_3\delta$	Células granulares de giro dentado, la corteza cerebral y predominantemente en el estriado.
$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	Neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.
$\alpha_6\beta\gamma_2$ $\alpha_6\beta_2\delta$ $\alpha_6\beta_3\delta$	Células granulares del cerebelo y el núcleo coclear.

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

En las células piramidales del hipocampo, la activación del receptor GABA_B incrementa la conductancia de K⁺ sin afectar la conductancia de Ca²⁺. Este hallazgo indica que los receptores y los canales dependientes de K⁺ y de Ca²⁺ son distintos en la periferia y el SNC (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988)

1.6 Fisiología del sistema GABAérgico

Como se ha descrito, el GABA actúa en ambas membranas de la sinapsis. Este aminoácido es acumulado en las vesículas sinápticas con el transportador de aminoácidos, que también es usada para la glicina (Foster y Kemp, 2006). El efecto a nivel presináptico se observa mediante la activación del receptor GABA_B y una subsecuente disminución de la entrada de Ca²⁺ al botón terminal, generando así una disminución de liberación de neurotransmisores y estabilizando el potencial de membrana en reposo.

La concentración de Cl⁻ en el exterior de la célula es 10 a 20 veces mayor (150 mM) que en el interior. La dirección del flujo iónico depende de la fuerza electroquímica, la cual es determinada por el potencial de membrana en reposo y el gradiente de concentración del Cl⁻, así como del potencial de equilibrio del ion. El efecto del GABA se debe a un incremento rápido de la conductancia de Cl⁻, lo cual tiene un efecto hiperpolarizante de la membrana neuronal (Carlson, 2006; Brailowsky, 2000; Bormann, 1988). En algunas neuronas se fortalece la inhibición con el incremento de la conductancia lenta de K⁺. Este evento es conocido como potencial posináptico inhibitorio (IPSP) que puede ser rápido (menos de 100 milisegundos) o lento (más de 100 milisegundos).

1.7 Sustancias que modulan la actividad del Receptor GABA_A

Las Bz, como el diazepam (Dz), son moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A, esto quiere decir que se unen al receptor en un sitio distinto al del GABA y facilitan la transmisión GABAérgica. Las Bz ejercen su acción en la subunidad α del receptor produciendo el aumento de la frecuencia de apertura del canal, en cambio, los barbitúricos, como el pentobarbital, aumentan la duración de apertura del canal (Jacob et al., 2008).

La picrotoxina es considerada un proconvulsivo, actúa bloqueando el ionóforo de Cl⁻. Otros moduladores como el pentilene-tetrazol y la penicilina, son convulsivantes debido a que bloquean la actividad GABAérgica (Jacob et al., 2008; Macdonald y Olsen 1994).

1.8 Alteraciones del Sistema GABAérgico

Dada la gran importancia de la modulación GABAérgica en el control de la excitabilidad neuronal, es válido pensar que esta función es el sustrato fisiológico para el desarrollo de diversos trastornos psiquiátricos como la ansiedad, la depresión o la adicción. Estos tres temas son importantes para el desarrollo de la tesis.

Muchas condiciones clínicas incluyendo los desordenes psiquiátricos están asociados al desbalance entre la excitación y la inhibición en el SNC, debido a esto uno de los principales objetivos terapéuticos es retornar a ese balance, además de que se ha demostrado que patologías como la epilepsia, ansiedad y la depresión pueden ser causadas por la alteración de este equilibrio (Foster y Kemp, 2006; Olsen, 2000); el sistema GABAérgico es el objetivo de un amplio rango de drogas en el SNC, incluidos los ansiolíticos, sedativos-hipnóticos, anestésicos y anticonvulsivantes.

Se ha asociado la pérdida del tono GABAérgico con la presencia de epilepsia en seres humanos, debido a la disminución de la actividad de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) que sintetiza GABA reduciendo de esta forma el control inhibitorio y propiciando descargas en la corteza (Cx). Asimismo, en modelos animales con focos epilépticos se ha encontrado que el número de terminales axónicas GABAérgicas y en consecuencia la densidad de procesos de transporte se ven disminuidos (Krogsgaard- Larsen, et. al.1987).

2. Adicción, Tolerancia y Dependencia

Desde tiempos muy remotos las sociedades han consumido sustancias que alteran el estado de ánimo y el funcionamiento cognoscitivo, por ejemplo: el café, el alcohol, el tabaco, la marihuana, la cocaína, las anfetaminas, los alucinógenos. Algunas de ellas han sido creadas con fines terapéuticos; sin embargo, en ciertos casos el progreso en el conocimiento farmacológico trae consigo nuevas drogas que propician modificaciones en el funcionamiento del SNC, como es el caso de los psicotrópicos.

Los fármacos creados con fines terapéuticos son utilizados para disminuir el dolor, asimismo, las sustancias usadas como drogas de abuso tienen como objetivo generar un efecto placentero, ambas a largo plazo, pueden generar síntomas y estados desagradables, conocidos como estados de tolerancia y dependencia (Brailowsky et al, 1991; 2000).

La tolerancia farmacológica se desarrolla tras la administración repetida de una droga a la misma dosis sin producir el mismo efecto que la primera vez por lo que se requiere aumentar la dosis (Brailowsky et al, 1991; 2000). Normalmente, conforme se aumenta la dosis de un fármaco, su efecto observado es mayor. Sin embargo, después de dosis repetidas se requiere de dosis cada vez más altas para obtener el efecto logrado en la primera exposición (desviación a la derecha de la curva dosis-efecto).

Existen diversas definiciones de la tolerancia, las cuales incluyen el evento fisiológico y el psicológico, estos son: tolerancia farmacocinética, farmacodinámica, aguda y condicionada.

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

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

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 subsecuentes disminuyen en cuestión de horas y a lo largo de la misma sesión (Lader y File, 1987).

La tolerancia condicionada implica la asociación de un contexto, físico o social con el consumo y efecto de una droga, después del uso prolongado de la misma en esas condiciones, el contexto de uso promueve de forma gradual una serie de respuestas de organismo que tienen como finalidad contrarrestar los efectos de la sustancia, generando un estado menor de sensibilidad a la

droga (Redolar, 2008) esta respuesta del organismo se conoce como respuesta compensatoria condicionada (Domjan, 2003; Graña y Carrobles, 1991).

La dependencia física es un estado de alteración producido por la administración de una droga, es decir que la droga afecta múltiples sistemas que antes estaban en equilibrio, al restablecerse el equilibrio se genera un estado de alostasis. La dependencia psicológica es una condición en la cual la droga produce un sentimiento de satisfacción que requiere una administración periódica o continua para producir placer y evitar el efecto desagradable (Brailowsky, 1991; 2000), acompañada de un aumento en el consumo, el cual está aunado en invertir más tiempo en la búsqueda y obtención de la droga, lo que da como resultado disminución y descuido de actividades laborales y sociales así como daños físicos y psicológicos.

La prueba clínica de la dependencia física es la aparición del “síndrome de abstinencia” cuando la droga ha dejado de administrarse, su amplitud y duración depende de las variables farmacocinéticas. Cada tipo de sustancia conlleva síntomas característicos, que suelen ser contrarios a los efectos del fármaco, se necesita continuar con la administración de la droga para evitar los síntomas adversos y no por el placer que la ingesta de la droga produce per se (McLellan et al., 1992), esta condición es explicada claramente por la teoría del proceso oponente (Domjan, 2003; Graña y Carrobles 1991).

Tolerancia, dependencia física y síndrome de abstinencia son fenómenos biológicos que resultan como consecuencia natural del consumo y del retiro abrupto de ciertos fármacos o sustancias. Estos fenómenos biológicos se pueden producir en animales de experimentación. Estos modelos pueden ser un correlato del evento que se registra en el humano, aunado a que el receptor $GABA_A$ tiene afinidad por gran cantidad de sustancias cuyas propiedades los hacen capaces de generar estados como los descritos anteriormente.

2.1 El Síndrome de Abstinencia a GABA

En el curso de una investigación sobre la relación entre el GABA y la epilepsia (Silva-Barrat et al., 1988), se demostró un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo a la interrupción del tratamiento con GABA en el mandril fotosensible (Figura 3; Brailowsky et al., 1987; 1988).

En estos mandriles, la estimulación luminosa intermitente inducía la aparición de descargas epilépticas al nivel de la Cx cerebral acompañadas de mioclonias generalizadas. Mediante cánulas intracorticales la infusión crónica, el GABA provocó un potente efecto anticonvulsivo, el cual perduró a lo largo del periodo de infusión (7 días). En todos los monos, fotosensibles o no, en los que se administró el GABA, se constató la aparición de focos de actividad paroxística en el sitio de infusión al día siguiente de haber cesado el tratamiento. Se registró electroencefalográficamente (EEG) que el área infundida, independientemente de la corteza en la que se realizara, mostraba la presencia de poliespigas y de actividad en forma de espiga-onda. En el caso de la Cx motora se correlacionaba con la aparición de mioclonías de la pata posterior contralateral al hemisferio infundido y en algunos animales aparecieron sacudidas “mioclónicas” (Brailowsky et al., 1987, 1989; Brailowsky 1991).

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

Tanto en monos como en ratas, la interrupción abrupta de la infusión intracortical crónica de GABA fue seguida de la aparición de un foco epiléptico localizado en la zona infundida y caracterizado por descargas en forma de espigas (ver la Figura 3). Las manifestaciones EEG se presentaban en el área de infusión, y en las etapas finales del fenómeno, las descargas desaparecieron gradualmente para sólo reaparecer en la fase de sueño de

ondas lentas, (Brailowsky et al., 1989; 1987; 1988; Will et al., 1988; Fukuda et al., 1987, Montiel et al., 2000).

A este fenómeno de hiperexcitabilidad se le llamó “Síndrome de Abstinencia al GABA” (SAG; LeGal La Salle et al., 1988; Silva-Barrat et al., 1992), además de las crisis convulsivas los animales mostraban otros signos clínicos tales como: mioclonus de la pata posterior contralateral al hemisferio infundido, movimiento incesante de las vibrisas, irritabilidad y aumento de la conducta exploratoria. Hay datos de dependencia física ya que la re-infusión de GABA hace que desaparezcan las manifestaciones EEG (Brailowsky et al., 1988). Finalmente, también hay datos de tolerancia cruzada a Bz (diazepam; Dz) y a barbitúricos (pentobarbital), ya que la administración de estas drogas GABAérgicas no modifica la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica en las primeras 24 h (Brailowsky et al., 1992).

Se han observado cambios metabólicos producidos por el SAG cortical con la técnica de la 2-desoxiglucosa (2-DG) radioactiva. Mediante esta técnica es posible estudiar el metabolismo glucídico cerebral ya que la 2-DG se acumula en el sitio de utilización. Así, las áreas cerebrales más activas acumularán más 2-DG, la cual puede ser visualizada mediante autorradiografía. De esta manera se observó un aumento significativo en el consumo local de glucosa (3 a 5 veces con relación al control) no solo del área cortical involucrada en la generación de la actividad paroxística, sino también en la zona talámica ipsilateral de proyección de dicha área cortical (núcleos posterior oralis, ventro-postero-lateral, central lateral, ventro-lateral y reticular) en animales sacrificados 60 min después de haberse iniciado el SAG. Estas regiones hipermetabólicas corresponden con las áreas de gliosis que se cuantifican en animales sacrificados 10 días después de interrumpirse la actividad paroxística (Brailowsky, 1991).

Las infusiones crónicas intracorticales del aminoácido impactan sobre la actividad de la GAD, durante el SAG se manifiesta una reducción de su

actividad aproximadamente 40%, tanto en ausencia como en presencia del cofactor, el PLP, a nivel del sitio de infusión con el aminoácido (Salazar et al., 1994).

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

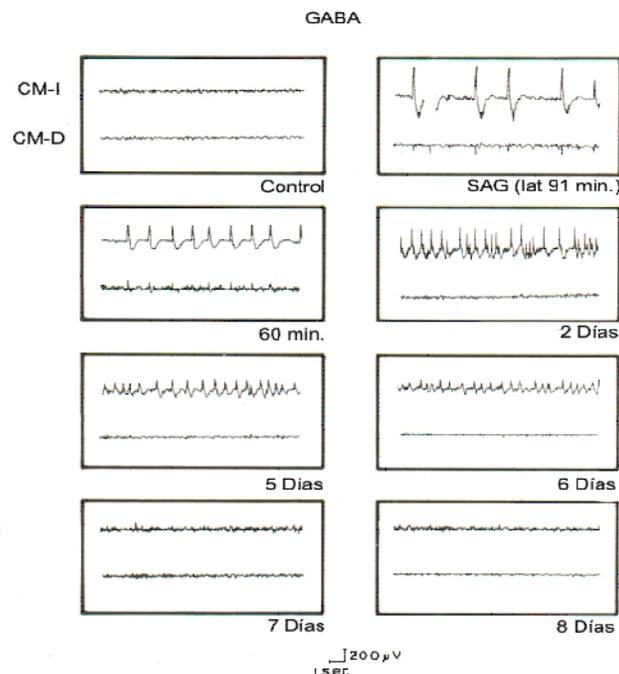


Figura 3. Electroencefalograma característico de SAG en la rata. La interrupción de la infusión de GABA en la corteza somatomotora izquierda (CM-I) induce una actividad espiga onda con latencia promedio de 90 min, duración de 7 días (tomado de Calixto et al., 1995).

La respuesta de estas descargas epileptiformes a los diferentes fármacos anticonvulsivos, administrados por vía sistémica, varía de acuerdo al tiempo de evolución de la actividad paroxística, ya que el foco epiléptico es extraordinariamente resistente a los anticonvulsivos usados clínicamente (fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepinas) e incluso el fármaco de elección en casos de status epiléptico: el Dz lo que vuelve a sugerir tolerancia cruzada. De tal forma que el SAG es un modelo de epilepsia intratable en los primeros estadios de evolución (Brailowsky, 1991).

A partir del segundo día del SAG se empiezan a observar efectos anticonvulsivos cuando se administran fármacos antagonistas del receptor al NMDA como la ketamina, el amino-fosfonoheptanoato (APH) y el MK-801, o Bz como el clonazepam (Brailowsky et al., 1988; 1990; Brailowsky, 1991).

En estudios orientados a reproducir *in vitro* este fenómeno de hiperexcitabilidad neuronal, se realizaron experimentos en rebanadas de hipocampo de rata (García-Ugalde et al., 1992). Esta es una preparación frecuentemente empleada en el estudio experimental de la epilepsia por la facilidad con la que se pueden reconocer sus elementos anatómicos (neuronas piramidales de las áreas CA1 y CA3 y sus vías de llegada y salida) y por la gran incidencia de epilepsia del lóbulo temporal (psicomotora), debido a esto su estudio es de importancia clínica y experimental.

Se le han descrito al SAG tres distintos patrones en el EEG (Brailowsky et al., 1992):

- **Patrón I:** se presenta actividad espiga-onda única unilateral, de 200 a 700 μ V de amplitud y a una frecuencia de 0.5-3 Hz.
- **Patrón II:** en él aparecen complejos espiga-onda seguido de poliespigas de alta frecuencia.

- **Patrón III:** en él se encuentran espigas de propagación contralateral (bisincronía), usualmente con mayor amplitud en el lado de la infusión, de varios segundos de duración.

Comúnmente, el SAG se inicia con el patrón I, que predomina a partir del segundo día y hasta el final del síndrome. Los patrones II y III se observan en las primeras 4 a 6 horas y son raros después de 12 horas de evolución. La aparición de las descargas paroxísticas tiene una latencia promedio de 90 minutos (Brailowsky et al., 1990). En las primeras horas de evolución del SAG, se presenta una resistencia farmacológica a drogas GABAérgicas exceptuando al GABA (Calixto, 2001).

En resumen, desde el punto de vista clínico, durante el SAG ocurren varios cuadros observados en el humano:

1. Un cuadro de estado epiléptico focal (actividad paroxística continua localizada en una zona específica; Brailowsky, 1999).
2. Un síndrome de epilepsia parcial continua (síndrome de Kojewnikow), caracterizado por descargas focales asociadas a mioclonus y a descargas epileptiformes lateralizadas periódicas (Calderón de la Barca Gázquez et al., 2005; Brailowsky, 1999).
3. Desde el punto de vista fisiopatológico, el SAG se encuentra relacionado con todos aquellos síndromes caracterizados por alteraciones de la neurotransmisión inhibitoria y se asemeja a otros modelos de epileptogénesis inducida por bloqueadores del GABA, como la Bic o la picrotoxina. Ambos modelos se acompañan de hiperexcitabilidad neuronal, de hipermetabolismo glucídico y de cambios neuropatológicos compatibles con excitotoxicidad (Brailowsky, 1991; Olney et al. 1986).
4. Desde el punto de vista neurofarmacológico, el SAG constituye un fenómeno dependiente de receptores GABA_A, que se acompaña de disminución en la actividad de la síntesis de la GAD y de tolerancia a agonistas específicos de este receptor (isoguvacina). Por otra parte, la

reactividad farmacológica del SAG varía con el tiempo de evolución: extremadamente resistente en las primeras 24 horas, y sensible a Bz después (Calixto, 2012; Brailowsky et al., 1990, Brailowsky, 1991).

5. El SAG puede relacionarse a síndromes de abstinencia semejantes a los que se observan después de suspender bruscamente la administración prolongada de sustancias como las Bz y el alcohol, que se caracterizan por facilitar la transmisión GABAérgica (Cornejo, 2011; Uussi-Okari y Korpi, 2010; Brailowsky y García, 1999).
6. El animal con SAG presenta dependencia al GABA y muestra alteraciones conductuales como hipersomnia, irritabilidad y aumento de la actividad exploratoria, además de movimientos mioclónicos de la pata trasera contralateral al hemisferio infundido y ocasionalmente sacudidas “mioclónicas” (Brailowsky et al. 1988; 1990).

3. Modulación GABAérgica de la Conducta

3.1 Hormonas Esteroides Sexuales

Las hormonas esteroides sexuales, andrógenos, progestágenos y estrógenos, son derivados de un mismo precursor común, el colesterol. Tanto hombres como mujeres sintetizan esas hormonas, pero en distintas concentraciones. Ambos sexos también tienen receptores para estas sustancias; aunque, hay regiones con diferencia en la densidad de los receptores según el sexo (Flanagan- Cato, 2011; Purves et al., 2006; Pisu y Serra, 2004). Dado que los esteroides sexuales son lípidos, son permeables para la célula y tienen efectos intracelulares modificando la expresión genética. Las neuronas tienen la capacidad de seleccionar y concentrar esteroides específicos por medio de receptores y proteínas fijadoras tanto en el citoplasma como en el núcleo (Purves et al., 2006; Stoffel-Wagner, 2001).

Un “esteroide neuroactivo”, es un esteroide que, independientemente de su origen, es capaz de modificar la actividad neuronal, incluyendo todos esteroides naturales y sintéticos que pudieran modificar la excitabilidad de las

neuronas mediante su unión al receptor de la membrana de la misma manera en que actúan los neurotransmisores (Martín-García et al., 2007; Pisu y Serra, 2004).

Un ejemplo de esteroides neuroactivos son las progestinas, las cuales son secretadas por los ovarios y las glándulas suprarrenales, éstas son metabolizadas por la glía por acciones de las enzimas 5 α -reductasa (5 α -R) y 3-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3-HSOR). Sin embargo, los metabolitos periféricos se dividen rápidamente en el hígado; la P₄ puede tener efectos en el cerebro por su rápida conversión a AloP o por una mayor formación por las numerosas células gliales (Martín-García et al., 2007).

3.2 Neuroesteroides

Los neuroesteroides son una subclase de esteroides que pueden sintetizarse *de novo* en el SNC a partir del colesterol, las principales células esteroideogénicas son las neuronas y las células gliales (oligodendrocitos y astrocitos; Martín-García et al., 2007).

La biosíntesis de todos los neuroesteroides comienza con la conversión enzimática del colesterol a pregnenolona (Figura 4). La etapa limitante es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna donde se encuentra la primera enzima, el citocromo P450_{scc}. El transporte de colesterol en la membrana mitocondrial es mediado principalmente por dos enzimas: la proteína de la regulación aguda de la esteroideogénesis (StAR, por sus siglas en inglés) y el receptor mitocondrial de Bz, las cuales pueden actuar sinérgicamente para incrementar la producción de neuroesteroides (Martín-García et al., 2007; Schumacher et al., 2003).

Esta síntesis *de novo* de pregnenolona (precursor de todos los neuroesteroides; Figura 4) en el cerebro ocurre independiente de la secreción de las glándulas periféricas y en respuesta a los estímulos reproductivos relevantes, por ejemplo, la conducta sexual (CS) que permite un rápido

aumento de AloP en el cerebro medio en ratas intactas receptoras, ovariectomizadas (Ovx) y adrenalectomizadas con tratamiento de estradiol (E_2 -priming; Martín-García et al., 2007).

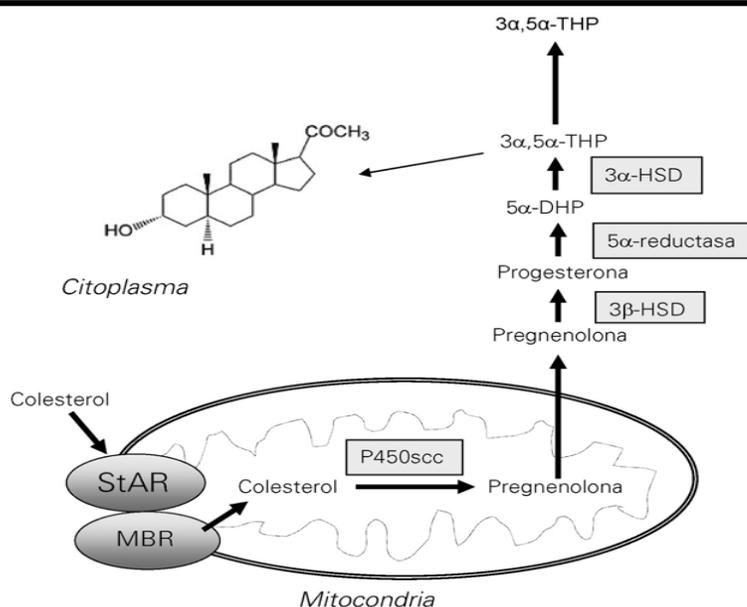


Figura 4. Biosíntesis de los neuroesteroides moduladores del receptor $GABA_A$. Se muestra la ruta de síntesis de Alop (alopregnanolona) desde el colesterol. La proteína de regulación aguda de la esteroidogénesis (StAR) podría interactuar con el receptor periférico a benzodiazepinas para facilitar el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial. P450scc: citocromo P450, 3α, 5α-HSD: 3α ó 3β hidroxisteroide deshidrogenasa; 5α- DHP: 5α- dihidroprogesterona. Tomado de: Martín-García et al., 2007.

La principal acción de los neuroesteroides en el cerebro es a través de la acción en los receptores ionotrópicos, siendo la modulación alostérica positiva de los receptores $GABA_A$ la más estudiada (Martín-García et al., 2007; Smith et al., 2007; Haage et al., 2005).

La pregnenolona es el neuroesteroide más abundante en el cerebro humano, cuantificado en regiones como: el hipocampo, la amígdala, la Cx frontal, el estriado, el hipotálamo y el cerebelo (Martín-García et al., 2007; Haage et al., 2005).

Los neuroesteroides y los esteroides neuroactivos son de mucha importancia en esta tesis, ya que modulan la actividad GABAérgica y tienen una fundamental participación en la expresión y mantenimiento de la conducta sexual, tanto en machos como en hembras.

3.3 Conducta Sexual

Como mencionamos anteriormente, los esteroides neuroactivos y los neuroesteroides son capaces de modificar la actividad GABAérgica, en este contexto, diversas investigaciones han tenido como objetivo elucidar las vías y estructuras que participan en la conducta sexual.

Existen estructuras cerebrales imprescindibles para la expresión de la conducta sexual: el área tegmental ventral (VTA), el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), el área preóptica medial (POA), la Cx frontal, la amígdala, el núcleo accumbens (NAc; Crews, 2010). El tracto mesocorticolímbico dopaminérgico, asciende del VTA, hacia el NAc y a la CX prefrontal, este recibe proyecciones del POA (Hull, 2007) formando el circuito necesario para la motivación, el reforzamiento y la ejecución de la conducta sexual.

A pesar de que todas esas estructuras participan en la expresión y el mantenimiento de la conducta sexual, existen diferencias sexuales en los patrones conductuales que se atribuyen a la acción de los esteroides neuroactivos y a la cantidad de receptores que tienen (Flanagan-Cato, 2011; Martín-García et al.; 2007; Hull y Domínguez, 2007).

Una de las estructuras que funcionan diferencialmente entre machos y hembras, es la secreción testicular (la testosterona es un modulador alostérico positivo del receptor GABA_A, Martín-García et al., 2007), la cual ocurre entre la edad de E18 y E19 en las ratas macho. Los receptores GABA_A que se expresan cerca del nacimiento son diferentes en la etapa adulta de los machos.

Atribuyendo la acción de la testosterona en etapas tempranas del desarrollo de las ratas macho, se ha descrito que el VMH es aproximadamente 25% más grande en machos que en hembras (Flanagan-Cato, 2011); sin embargo, es un sitio de acción importante para las hormonas ováricas (E_2 y P_4), permitiendo el reflejo de lordosis. Los andrógenos en este núcleo también participan en la expresión de la CS de la rata macho. La gran diferencia en la CS entre ambos sexos es que en los machos los niveles hormonales permanecen a través del tiempo y disminuyen paulatinamente en la vejez, a diferencia de las hembras, quienes están sometidas a ciclos (Flanagan-Cato, 2011; Frye et al., 2006).

En este contexto sabemos que los machos exhiben niveles mayores de receptores a andrógenos. La expresión de estos receptores es fundamental para la activación del VMH, debido a que la pérdida de la acción de los andrógenos bloquea el patrón conductual de los machos (Flanagan-Cato, 2011). La alta expresión de andrógenos y la enzima aromatasa en las regiones límbicas, proporciona aferencias hacia el VMH.

En el POA existe un núcleo que difiere notablemente entre la rata macho y la hembra. En realidad, en el macho el POA es de 3-5 veces más grande que en la hembra. Es el sitio neural que regula la actividad sexual de los machos en varias especies animales, incluyendo a los primates (Fernández-Guasti y Rodríguez-Manzo, 1994; Larsson y Heimer, 1964; Perachio, et al., 1979, Hull et al., 1999; 1997).

Infusiones de agonistas GABAérgicos en este núcleo son capaces de abolir la CS en las ratas macho; en contraste, las infusiones de antagonistas favorecen la CS en roedores (Fernández- Guasti, et. al. 1985). La CS se ve deteriorada por lesiones bilaterales en esta estructura, mientras que la estimulación eléctrica (kindling) en esta área la facilita (Paredes, et al., 1990).

La CS de la rata macho esta mediada por la liberación de dopamina (DA), debido a la íntima relación entre esta conducta y la participación del

reforzamiento en el sistema mesolímbico (Hull et al., 1997). En este caso la DA tiene como tarea inhibir a las neuronas GABAérgicas en el POA para que la CS de los machos se presente. El POA tiene una gran liberación de DA durante la conducta precopulatoria, justificada por las vías sensoriales de entrada a este núcleo, y el efecto de las hormonas que hacen relevante al estímulo sexual (hembra en estro).

También se ha encontrado que la administración intraperitoneal (i.p.) de agonistas GABAérgicos, tienden a disminuir la CS; sin embargo, esto ha sido atribuido al impacto en la motilidad. El baclofén, agonista GABA_B aplicado i.p., tiene como efecto inhibir los reflejos peneanos necesarios para la penetración (Paredes et al., 1997).

En el caso de los inhibidores de la GABA-T, cuya propiedad es producir altas concentraciones de GABA en el cerebro, tienen un efecto desfavorable en la CS disminuyendo las intromisiones, y en dosis altas, inhiben por completo la conducta (Agmo et al. 1991; Paredes y Agmo, 1991); recordemos, que las neuronas GABAérgicas en el POA inhiben la expresión de la conducta sexual, en cambio la actividad locomotora y la ejecución motora son controlada por otros sistemas.

La presencia de testosterona (T) aumenta la acción de la óxido nítrico sintetasa, esta enzima produce óxido nítrico, en machos intactos o gonadectomizados (GDX) con tratamiento de T e influye positivamente en la liberación de DA en la fase precopulatoria, aumentando la respuesta al estímulo e incrementando la probabilidad, la tasa, y la eficiencia de la copulación. Además, en la fase post eyaculatoria (periodo refractario), la cantidad de GABA en el fluido cerebro espinal aumenta (Qureshi y Söderstem, 1986), sugiriendo la participación del GABA en la inhibición de la conducta sexual.

En el caso de las ratas hembras, ha sido descrito claramente que la CS es mediada por efectos no-genómicos, como el flujo de iones y la acción de

neuroesteroides (receptores GABA_A) en el VTA (Frye, 2001); y por efectos genómicos en el VMH, activando la interacción con el ADN y la transcripción genética, a través de los receptores membranales a progestinas que son moduladoras alostéricas positivas del receptor GABA_A, aunado a la acción de estradiol que induce receptores a progestinas en las hembras (Frye, 2009).

Algunos de los efectos de la P₄ para facilitar la lordosis pueden deberse en parte a las acciones de la AloP. Existen datos que demuestran que los niveles de P₄ y AloP son elevados en el mesencéfalo de ratas sexualmente receptivas. Los niveles de AloP en lugar de P₄, tienen mayor correlación con el inicio de la respuesta lordótica natural en ratones receptivos. La AloP es la más eficaz de todas las progestinas para facilitar e inducir la lordosis (Frye y Paris, 2001).

3.4 Etapas de la Cópula de la Rata

La CS de la rata macho se distingue en actividades que se conocen como A) precopulatorias, B) copulatorias y C) postcopulatorias. Durante la conducta precopulatoria, el macho y la hembra se persiguen, olfatean la región ano-genital, 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, éstas consisten en mover rápidamente las orejas, correr en zig-zag o dar saltos pequeños. La duración de la conducta precopulatoria es variable, puede durar pocos segundos o algunos minutos (Lucio y Tlachi-López, 2008).

Finalmente, en esta descripción la conducta copulatoria implica la ejecución de diversas posturas y movimientos que permiten la inserción peneana y la expulsión seminal; conocidos como patrones conductuales copulatorios (Lucio y Tlachi-López, 2008).

3.5 Patrones Conductuales Copulatorios

Los patrones conductuales durante la cópula de la rata macho son tres: A) monta, B) intromisión y C) eyaculación; a ese conjunto de actividades se le conoce como serie copulatoria (Figura 5A).

Al hacer una monta (Figura 5A), la rata macho se coloca sobre la grupa de la hembra, apoya sus regiones pélvica y perineal, sujeta a la hembra y le palpa los flancos; al mismo tiempo, realiza movimientos pélvicos rítmicos hacia adelante y hacia atrás; posteriormente, el macho realiza una desmonta lenta (Lucio y Tlachi-López, 2008; González y Hernández, 2002).

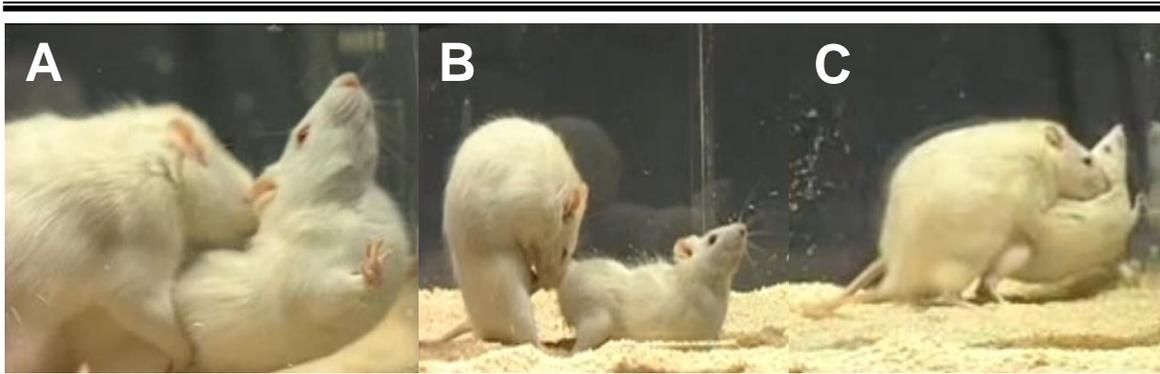


Figura 5. Conducta Sexual. En **A**, se observa la conducta de intromisión de la rata macho, así como la postura estereotipada de lordosis de la hembra. En **B**, se muestra la conducta de auto-acicalamiento del macho después de la intromisión. En **C**, se ejemplifica la conducta de eyaculación, la cual suele ser más prolongada.

Si el macho sujeta y palpa los flancos de la hembra adecuadamente producirá el reflejo de lordosis (arqueamiento del dorso que se acompaña de la elevación de la cabeza y grupa; así como desviación de la cola, Figura 5A; González y Hernández 2002; Hull et al., 2006; Lucio y Tlachi-López, 2008).

El patrón copulatorio de intromisión (Figura 5B) se identifica cuando el macho realiza un movimiento pélvico de penetración, luego se desmonta bruscamente hacia atrás y se autoacicala la región genital (Figura 5B; González y Hernández 2002; Hull et al., 2006; Lucio y Tlachi-López, 2008).

Las intromisiones propician que el macho alcance su umbral de eyaculación, es entonces cuando el macho expele el semen, desplegando el

patrón copulatorio de eyaculación (Figura 5C). Durante la eyaculación, el macho monta a la hembra, el último de los movimientos pélvicos se caracteriza por ser más profundo y duradero que el de una simple inserción del pene; en ese momento expelle y deposita el semen en la vagina. Inmediatamente después, el macho eleva la porción superior del cuerpo, extiende hacia atrás los lados de las extremidades anteriores y se desmonta lentamente para luego autoacicalarse los genitales, particularmente el pene (Lucio y Tlachi-López, 2008; González y Hernández 2002).

La conducta postcopulatoria se exhibe después de cada eyaculación, la cual comprende el periodo refractario absoluto y relativo. Durante el periodo refractario absoluto, el macho presenta muy poca locomoción, incluso la apariencia de estar dormido. El macho es insensible de cualquier estímulo sexual y no responde a otros estímulos del medio ambiente. Durante el periodo refractario relativo el macho empieza a responder a los estímulos que lo rodean y usualmente emite vocalizaciones ultrasónicas. La duración de esta conducta varía en minutos, periodo que se conoce como intervalo posteyaculatorio y comprende el tiempo que transcurre entre la eyaculación hasta que se presenta la monta o intromisión de la siguiente serie copulatoria. Este intervalo aumenta a medida en que haya más series eyaculatorias (Lucio y Tlachi-López, 2008).

En el caso de las hembras, la CS está asociada al ciclo estral de la rata dura cuatro días, comprende 4 etapas: 1) metaestro, 2) diestro, 3) proestro y 4) estró. Durante estas etapas, la concentración de hormonas esteroideas (E_2 y P_4) 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 fase estró desde la noche del día de la fase proestro, cuando el pico máximo de ambas hormonas ováricas está presente la hembra se encuentra en condiciones de estró natural. Una hembra receptiva o en fase de estró es aquella que muestra conductas proceptivas y receptivas (Flanagan- Cato, 2011; Lucio y Tlachi-López, 2008; González y Hernández 2002).

En este contexto, esto puede ser inducido farmacológicamente mediante la administración de hormonas sintéticas a hembras Ovx, se administra una dosis de E₂ 48 horas y P₄ 4 horas previas al inicio de la prueba; en estas condiciones, ambos patrones conductuales se presentarán: receptividad/ proceptividad, el evento tienen una duración de 8 horas aproximadamente (Flanagan- Cato, 2011).

3.6 Ansiedad y Depresión

Dada la amplia distribución de la neurotransmisión GABAérgica en el SNC, es evidente que su actividad estará modulando en cualquier función y conducta; aunado a esto, diferentes grupos de investigación se han interesado en elucidar la participación de esta neurotransmisión así como de sus receptores en distintas actividades cotidianas. Estructuras como la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, la Cx prefrontal y el tectum del cerebro medio son ricas en proyecciones GABAérgicas (Croakin et al., 2011).

En años recientes se ha retomado la hipótesis de la participación de las interneuronas GABAérgicas en conductas patológicas en respuesta al estrés crónico en animales y humanos: la ansiedad y la depresión, causadas por cambios en el ambiente. La primera, se compone de los mecanismos de miedo, los cuales dan aviso de la situación peligrosa, para evitar o enfrentar a la amenaza. Se ha considerado que ambas conductas se superponen y pueden ocurrir juntas, o que la primera antecede a la otra, así que se propone que los síntomas podrían responder al mismo tratamiento farmacológico y los mecanismos neuroquímicos que las subyacen podrían ser similares (Möhler, 2012).

Las estructuras cerebrales relacionadas con los trastornos depresivos son la Cx prefrontal, el núcleo estriado, la amígdala y el hipotálamo; se cree que el hipocampo y la neocorteza están involucrados en los aspectos cognitivos de la depresión, así como con el sentimiento de culpa, falta de autoestima, de esperanza y en las alteraciones de la memoria (Zandio, et. al., 2002).

El circuito de la amígdala y la Cx prefrontal están involucrados en la prominencia del estímulo y en el control de los mecanismos de atención, asociación e interpretación. Cuando la amígdala reconoce una amenaza, comienza un incremento en su función generando paradójicamente, en las regiones prefrontales una disminución de la actividad cortical (LeDoux, 2000; 2007; Zandio et. al., 2002; Coakin et al., 2011). En este circuito, distintos núcleos de la amígdala están encargados de enviar señales para distinguir como reaccionar ante la amenaza, ya sea para evitarla o enfrentarla. La inactivación de las neuronas GABAérgicas en la amígdala y en el hipocampo es parte del aprendizaje del miedo (Möhler, 2012).

La amígdala es una estructura límbica importante en las respuestas emocionales autonómicas y endócrinas a través de su conexión con el hipotálamo, ha sido descrita como pieza clave en el efecto ansiolítico de los neuroesteroides como la AloP al ser instilada en su núcleo central, además de disminuir los efectos de la ansiedad (Martín- García et al., 2007).

El nivel endógeno de neuroesteroides puede influenciar la respuesta al estrés; por ejemplo, la exposición de un agente estresante leve a un roedor (inmersión breve en agua a temperatura ambiente) o la inhalación breve de CO₂, provocan el aumento de los niveles de AloP y 5 α -dihidrodeoxicorticosterona (THDOC) en el plasma (Frye, 2001). Asimismo, diversos estudios han demostrado que la ansiedad se reduce tras la aplicación de fármacos como las Bz, agonistas del receptor GABA_A (Rodgers y Dalvi, 1997), las cuales aumentan la permanencia en brazos abiertos evaluada en la prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC).

Un modelo experimental que tiene como objetivo desarrollar un estado depresivo en roedores a consecuencia de un agente estresante agudo es el Nado Forzado (NF) produciendo así un estado de desesperanza aprendida, esa condición se presenta al no poder cambiar una situación no deseada (Abramson y Seligman, 1978; Willner, 1966). En la prueba de NF es posible medir 3 conductas:

1) nado, 2) trepado e 3) inmovilidad; tanto el nado como el trepado son consideradas conductas activas y son realizadas por los animales para tratar de evitar la situación aversiva, la tercera es una conducta pasiva, la cual aumenta progresivamente en el tiempo y además es la conducta tipo depresiva que cuantifica a detalle la prueba (Korte, 2001). El NF cuenta con una fase de estrés agudo en la que el animal no puede escapar de la situación amenazante, por más que trate de encontrar una salida, en este contexto la amígdala y la Cx prefrontal son fundamentales en la respuesta ante este evento (Möhler, 2012) y la segunda fase es la prueba en la que se pueden observar la conducta tipo depresiva identificada como inmovilidad, la cual es disminuida tras la administración de antidepresivos tricíclicos o inhibidores de selectivos de la recaptura de serotonina (ISSR, Detke y Lucky, 1996; Martínez-Mota et al., 2011). Además, se ha encontrado que la respuesta farmacológica a esta prueba y la presencia de las conductas está ligada al sexo y a la edad, teniendo un mayor tiempo de inmovilidad para las ratas macho y mejor respuesta a los antidepresivos tricíclicos en comparación con las hembras, quienes permaneces menos tiempo inmóviles y responden mejor a ISSR's.

Una de las actividades del receptor GABA_B es inhibir la liberación de otros neurotransmisores como la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE) y la DA, actuando como hetero-receptores (presinápsis; Croakin, 2011). En este contexto la administración de antagonistas de este receptor son capaces de evocar un efecto ansiolítico y antidepresivo (Frankowska, 2007).

Se han publicado tres hallazgos fundamentales de la importancia del GABA asociados a la depresión en pacientes diagnosticados con trastorno depresivo mayor, el primer trabajo muestra que existe una deficiencia en los niveles de corticales GABA (Bartholini et al., 1987), el segundo señala una disminución de los receptores GABA_A en la Cx cerebral (Petty et al., 1994) y por último la evidencia de que estos pacientes tienen menor número de neuronas GABAérgicas (Möhler, 2012). La ansiedad y la depresión convergen en la

disminución y deficiencia de la actividad de la neurotransmisión GABAérgica, por ello la propuesta terapéutica, está en función del GABA para ambos desordenes.

Es evidente que la actividad epileptiforme inducida por el SAG puede tener un efecto en la conducta sexual, de ansiedad y de depresión debido a que las tres son moduladas por las mismas estructuras.

II. Justificación

Las modificaciones ambientales dan como resultado cambios en el estilo de vida de las personas por eso deben estar más capacitadas para enfrentar las exigencias del mundo externo. Una de las consecuencias más graves y prevalentes es el consumo de drogas que va en aumento y que además se consumen cada vez a menor edad. De acuerdo a la *Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México*, en el año 2007, los trastornos del uso de sustancias en nuestro país son cercanos al 10% del total de la población, siendo los más frecuentes el abuso del alcohol y las Bz, la cuales son capaces de modular al mismo receptor.

Un tratamiento prolongado con drogas, como las GABAérgicas, generan estados de tolerancia y dependencia, la consecuencia es la alteración de mecanismos internos necesarios para la supervivencia, la cual puede llegar a ser patológica, resultando en grupos de personas con desordenes como ansiedad y depresión, teniendo un impacto desfavorable en la conducta sexual, esta situación es fácilmente observable en la clínica; sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado una estrategia farmacológica eficaz para evitar las consecuencias, tanto físicas como conductuales.

Estas alteraciones pueden estar sujetas a los cambios hormonales, sustancias que modulan positivamente al receptor GABA_A, como los andrógenos, siendo el más importante la testosterona, por lo tanto proponemos identificar si el factor hormonal influye en la expresión de la abstinencia a

GABA; así como, el impacto que tiene en la aparición de la ansiedad y la depresión.

¿Durante la fase temprana del SAG se presentan en la misma intensidad la ansiedad y la depresión?, ¿Cuáles son los cambios que puede suscitarse en la CS de un animal con SAG? Este estudio representa una pieza clave para elucidar la participación de la ausencia de inhibición en el cerebro de las ratas macho, en la expresión de conductas de alta prevalencia clínica; para ello se utilizaron cuatro técnicas diferentes pero complementarias para identificar la modificación conductual durante el SAG en ratas macho sexualmente expertas y GDX. Por lo tanto los resultados de la presente tesis sustentarán como las modificaciones en la actividad GABAérgica puede influir directamente en la expresión de algunas conductas (ansiedad, sexual y depresión).

III. Planteamiento del Problema

La abstinencia a drogas que modulan la actividad GABAérgica es muy frecuente, se desconoce el impacto conductual que el desequilibrio de la función inhibitoria cortical puede causar en la aparición de ansiedad y depresión. Se sabe que las estructuras que participan en estas conductas son las mismas, que el GABA tiene una importante participación y que su ausencia promueve la manifestación de estos trastornos (Möhler, 2012; Martínez- Mota et al., 2011; Martín- García et al., 2007; Detke y Lucky, 1996). La CS se puede ver afectada como consecuencia de la presencia de ansiedad y depresión. Se pretende estudiar la influencia del SAG en el perfil ansiogénico y depresivo, así como valorar cambios en la CS de la rata macho.

IV. Objetivos

General

Realizar un análisis conductual y electrofisiológico que identifique la hiperexcitabilidad neuronal causada por el SAG valorando cuantitativamente su impacto en la conducta sexual, ansiedad y depresión de la rata macho.

Específicos

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

- Cuantificar el número de complejos espigas-onda que aparecen en el SAG en la fase temprana mediante un registro electroencefalográfico.
- Identificar el efecto del SAG en la actividad EEG en un plazo de 10 días.

En los primeros estadios de la abstinencia, relacionar los cambios conductuales con la hiperexcitabilidad neuronal:

- Cuantificar en el segundo día del SAG la medición de la ansiedad utilizando el LEC.
- Cuantificar en el cuarto día de SAG la conducta tipo depresiva a través de la prueba de NF.

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

- Durante el segundo día del SAG se analizará el número de montas e intromisiones así como la duración de la serie copulatoria.

Para evaluar la participación de los andrógenos endógenos secretados por las gónadas en el SAG:

→ Evaluar la ausencia de gónadas en la expresión electroencefalográfica del SAG; así como, su impacto en las conductas de ansiedad y tipo depresiva.

Variables de trabajo

Independiente

Retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA en la corteza somatomotora derecha para inducir el SAG.

Gonadectomía para evaluar diferencias conductuales, la inducción y mantenimiento del SAG a nivel del EEG.

Dependiente

1. Incremento de la excitabilidad cortical en el EEG (complejos espigas-onda y potencia) en ratas macho.

Evaluación de tres conductas distintas en la etapa inicial del SAG (segundo y tercer día):

1. **Ansiedad:** identificada en el LEC mediante la evaluación del número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y brazos cerrados.
2. **Conducta sexual:** cuantificando el número de montas, el número de intromisiones y la duración de la serie copulatoria.
3. **Depresión:** evaluada a través de la prueba de NF (número de eventos conductuales y porcentaje tiempo en nado, trepado e inmovilidad).

Hipótesis

1. La abstinencia a GABA en la corteza cerebral, que se cuantifica como actividad epileptiforme en el EEG, incrementará la conducta sexual evaluada por el aumento de la duración de la serie copulatoria, el número de montas y de intromisiones.
2. La disminución de la inhibición en la Cx inducida por el SAG se manifestará conductualmente en un estado de ansiedad.
3. La reducción de la neurotransmisión GABAérgica provocada por el SAG inducirá la aparición de un estado depresivo.
4. Si las gónadas participan en la expresión del SAG entonces existirán diferencias en la ansiedad y la depresión entre los machos sexualmente expertos con respecto a los GDX.

V. Materia y Método

Sujetos

Se utilizaron 42 ratas macho de la cepa Wistar (200-300 g) proporcionadas por el bioterio del INPRF y de la Facultad de Medicina de la UNAM, en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25°C), agua y alimento *ad libitum*, con un ciclo de luz oscuridad invertido (12/12h; 22:00-10:00h) 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); en todos los procedimientos experimentales se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales.

Los sujetos de experimentación fueron alojados en cajas de acrílico transparente en grupos de 3–5 animales durante los días de entrenamiento, el cual será descrito posteriormente, al terminar la cirugía estereotáxica fueron mantenidos en cajas individuales y permanecieron así hasta el final del procedimiento. Cada uno de los experimentos fue realizado durante el ciclo de oscuridad de las ratas macho.

Diseño experimental

Variable independiente	Variables dependientes
Inducción del SAG	Medición de la actividad EEG
Gonadectomía+ inducción del SAG	Cuantificación de las modificaciones conductuales: Conducta de Ansiedad Conducta sexual Conducta Depresiva

Sustancias

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

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

Antiséptico (Microcyn, Oculus Technologies de México).

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

Lidocaína con epinefrina (265 Laboratorios PiSA de México).

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

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

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

Entrenamiento para ratas sexualmente expertas

Antes de iniciar las sesiones experimentales se realizó el entrenamiento para la adquisición de la conducta sexual de las ratas macho. Para ello fue necesario utilizar ratas hembra ovariectomizadas (OVX), el procedimiento de esta cirugía fue le siguiente: se anestesió a la rata hembra con pentobarbital sódico (50 mg/Kg, i.p.), se rasuraron los flancos abdominales. Se aplicó anestesia local (lidocaína). Después de la anestesia, se limpió la zona con isodine, se realizó una incisión usando las tijeras para separar la piel y el músculo, se tomó el final de la tuba uterina, cerca del ovario, se ligó con la sutura absorbible y sin causar hemorragia, se cortó el ovario; se cerró la cavidad abdominal. Se esperaron dos semanas para la recuperación post-quirúrgica de la rata hembra, en ese tiempo también se redujeron los niveles endógenos tanto de E_2 como de P_4 .

Para que las ratas hembra presentara el reflejo de lordosis así como las conductas estereotipadas de la fase receptiva se administró una dosis única subcutánea de 0.1 ml de E_2 (10 μ g/ml) para sensibilizar a los receptores a P_4 una semana antes de comenzar con el tratamiento hormonal (estro inducido) conocido como *hormona priming*.

Posterior a ese procedimiento se colocó a la rata macho en un redondel de acrílico (60 cm de diámetro x 40 cm de alto), iluminado con luz roja (40 W), con una cama de 5 cm de aserrín durante 5 minutos. Posteriormente, se situó a una hembra Ovx en el redondel, previamente ciclada farmacológicamente con la aplicación de E₂ (10 µg/ml) 48 h antes de la prueba y de P₄ (2 mg/ml) 4 h previas. Los criterios de la adquisición de la conducta fueron los siguientes: la rata macho debía aprender a montar y a realizar intromisiones, si sólo realizó montas, la sesión terminaba a los 15 min, al realizar la primera intromisión el macho contó con 30 min más para finalizar una serie copulatoria que se consumó con la eyaculación (Lucio y Tlachi-López, 2008).

El entrenamiento se realizó cada 2 días durante 2 semanas (10-16 días), los machos adquirieron gradualmente las conductas copulatorias. El criterio de inclusión para que las ratas macho fueran consideradas sexualmente expertas fue que completaran al menos 4 series copulatorias de las 6 sesiones totales (Lucio y Tlachi-López, 2008).

Cirugías

Gonadectomía Machos

Con el objetivo de identificar la influencia hormonal en la expresión del SAG, así como su impacto en la ansiedad y la depresión se utilizaron ratas machos a las cuales se les gonadectomizó, es importante mencionar que estos animales no fueron entrenados para adquirir la conducta sexual.

Para extirpar las gónadas de las ratas macho, se les anestesió con pentobarbital sódico (30mg/Kg, i.p.), se procedió a rasurar la zona ano-genital y a esterilizarla con isodine; se inyectó lidocaína en forma de cruz en los testículos de la rata, así como en el escroto, se realizó una pequeña incisión con el bisturí en las tres capas que cubren al testículo. Una vez expuesto el testículo, se ligó el conducto deferente y la arteria testicular sin causar hemorragia, esto se repitió con el otro testículo. Finalmente se suturó el

escroto. Fueron indispensables al menos 21 días de recuperación para la disminución endógena de andrógenos.

Cirugía Estereotáxica

Para la implantación del complejo cánula/electrodo fue necesario anestésiar a los animales con pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.) con una pequeña dosis de lidocaína en las orejas. Una vez anestesiado el animal se colocó en un sistema estereotáxico de una torre; se esterilizó la zona con isodine, se le inyectó lidocaína vía subcutánea en el cuero cabelludo, posteriormente se realizó un corte en la piel. Tomando como referencia bregma y la línea media se colocaron 2 cánulas de infusión intracortical: 1.5mm de profundidad, 2mm posterior a bregma, 2.5mm de la línea media. Asimismo, se colocaron en el cráneo 3 tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre, dos de registro 4mm posterior a bregma y uno de referencia sin actividad anterior a bregma. Las cánulas y los tres electrodos se unieron a un conector y se fijaron al cráneo con cemento acrílico dental; con el fin de asegurar la permeabilidad de las cánulas se les introdujo una “guía removible”. Al término de la cirugía se les administró un antibiótico de forma profiláctica. Los animales permanecieron una semana en recuperación antes de cualquier manipulación.

Aparatos e Instrumentos

Registro EEG

Se realizó mediante un cable de registro (5 terminales faradizadas adaptadas a conexión directa con amplificadores P511 Grass). Amplificación 20; filtros de frecuencia baja 3Hz/1000 y frecuencia alta 0.3KHz. La señal fue adquirida con el software Poliview 8 (National Instruments) en una computadora y analizados con el sistema ach4dq mediante el uso de filtros digitales de 0-40 Hz y eliminación de saturación.

El conteo de espigas se realizó mediante la identificación de las primeras 10 espigas representativas después del inicio del SAG. Posteriormente se promediaron los valores obtenidos para así establecer un nivel de disparo, a partir del cual consiguió el número de complejos espiga-onda. Se obtuvo el valor de la potencia total del EEG ($\mu V^2/Hz$) en la banda de 4-20 Hz a partir del espectro de frecuencia de Wavelets.

Laberinto Elevado en Cruz para Evaluar Ansiedad

Para evaluar la conducta de ansiedad en los roedores se utilizó el LEC. Es una cruz de madera elevado a 50 cm del piso con 4 brazos; un par opuesto con paredes de 40 cm de alto denominados brazos cerrados (BC) de 50 x 10 cm cada uno y otro par con las mismas dimensiones llamados brazos abiertos (BA) unidos por un cuadro central de 10 x 10 cm, durante la realización de la prueba se iluminó con luz roja (40W).

Para la ejecución de la prueba se colocó a la rata en el centro del LEC con la cabeza hacia uno de los BA durante un periodo de 5 min. Se evaluó: 1) el número de entradas a BA y a BC; así como, 2) el porcentaje de tiempo en cada uno de los brazos. El criterio para considerar una entrada es que la rata haya cruzado con las cuatro patas hacia el interior de los mismos.

En este paradigma un incremento en el tiempo invertido y el número de entradas a los BC es interpretado como la respuesta ansiogénica, mientras que el número total de entradas a ambos brazos, proporciona una medida de la actividad general (Fernández- Guasti y Picazo, 1999; Pellow et al., 1985). Todas las pruebas fueron registradas mediante el uso de una cámara de video (Sony HandycamMod DCR SX40).

Evaluación de la Conducta Sexual de la Rata Macho

Se realizó en un redondel de acrílico (60cm de diámetro x 40 cm de alto) con una cama de aserrín de 5 cm e iluminado con luz roja (40W), se colocó a la

rata macho durante 5 minutos para su habituación, posteriormente se ubicó a una rata hembra en fase de estro inducido. En esta prueba se cuantificó el número de montas, el número de intromisiones así como la latencia de la eyaculación.

Nado Forzado para Evaluar Conducta Depresiva

En un cilindro de vidrio templado (40 cm de altura x 20 cm de diámetro), con 27 cm de agua a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ se colocó al animal en el agua durante 15 minutos en la primera fase, la cual induce estrés agudo ya que el animal no puede escapar de la situación amenazante, exactamente 24 h después de la primera exposición se colocó al animal en las mismas condiciones con 5 min de duración.

Tras la fase de estrés agudo, se identifica un incremento en la conducta depresiva o pasiva (inmovilidad) en la cual el animal solo realiza los movimientos necesarios para mantenerse a flote.

Se identifican también dos conductas activas, la primera se define como la conducta de nado e integra movimientos de búsqueda y sumergimiento al fondo del vaso; la segunda es la conducta de trepado, se expresan movimientos vigorosos de las patas delanteras, por lo general contra el cristal.

En la prueba del NF se cuantificó el número de episodios de las conductas de nado, trepado e inmovilidad en periodos de 5 segundos (Porsolt et al., 1978).

Procedimiento experimental

Cada condición contó con sujetos asignados aleatoriamente en uno de cinco grupos (excepto el grupo SAG-GDX) descritos a continuación:

Grupo control. Se utilizaron ratas macho sexualmente expertas (entrenadas durante 10-16 días; n=12). Una semana después se les realizaron las pruebas

conductuales la primera fue el LEC, inmediatamente después la CS. Al siguiente día se realizó la fase 1 del NF y 24 h después se realizó la fase 2 del NF (Figura 1). Este grupo tuvo la finalidad de ser el sustento de comparación de las modificaciones conductuales del SAG.

Grupo SHAM. De igual forma se utilizaron ratas macho sexualmente expertas (entrenamiento de 10-16 días; n=5). El día siguiente a la finalización del entrenamiento se les sometió a la cirugía estereotáxica para la colocación del complejo cánulas-electrodos, dejando 8 días para la recuperación de la intervención quirúrgica. Posteriormente se evaluaron las pruebas conductuales de la misma forma antes indicada (Figura 1). A partir de una semana de recuperación quirúrgica y hasta el fin de los experimentos se realizaron registros EEG.

Grupo SAG. A un grupo de animales (n=12) después de ser entrenados sexualmente (10-16 días), operados por estereotaxia para colocarles el complejo cánula/electrodo y con su semana de recuperación, se les realizó un EEG control. Al día siguiente se les indujo hiperexcitabilidad neuronal tras el retiro abrupto de instilación intracortical de GABA (5 mM; 6 μ l/2 h) en la corteza somatomotora derecha, inmediatamente después se obtuvo el registro EEG durante 2 h. El día consecuente al inicio del SAG iniciaron las pruebas conductuales realizadas en el mismo orden cronológico explicado anteriormente (Figura 1).

Grupo SAG GDX. Para este grupo se utilizaron animales GDX sin haber sido entrenados para adquirir la conducta sexual (n=8), se les implantaron las cánulas y los electrodos, una semana después se les indujo el SAG, sólo se cuantificaron las conductas de ansiedad y de depresión (Figura 1).

Grupo SAG seguimiento. Este grupo de animales fue realizado para evaluar la duración del SAG (n=5); es decir, no fue entrenado ni se le hicieron las mediciones conductuales, únicamente, se registró la actividad EEG durante 10 días posteriores a la inducción del SAG (Figura 1).

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados en medias y error estándar (E.E.). Para la evaluación estadística de los resultados conductuales se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para cada una de las variables dependientes, con una significancia de $p \leq 0.05$, seguida de una prueba *Post Hoc* de Dunette mediante el uso del paquete estadístico GraphPad y las graficas se realizaron con el programa OriginPro 8.

Los datos de ansiedad, fueron mostrados en proporción, tanto en número de entradas, como porcentaje de tiempo siguiendo esta ecuación:

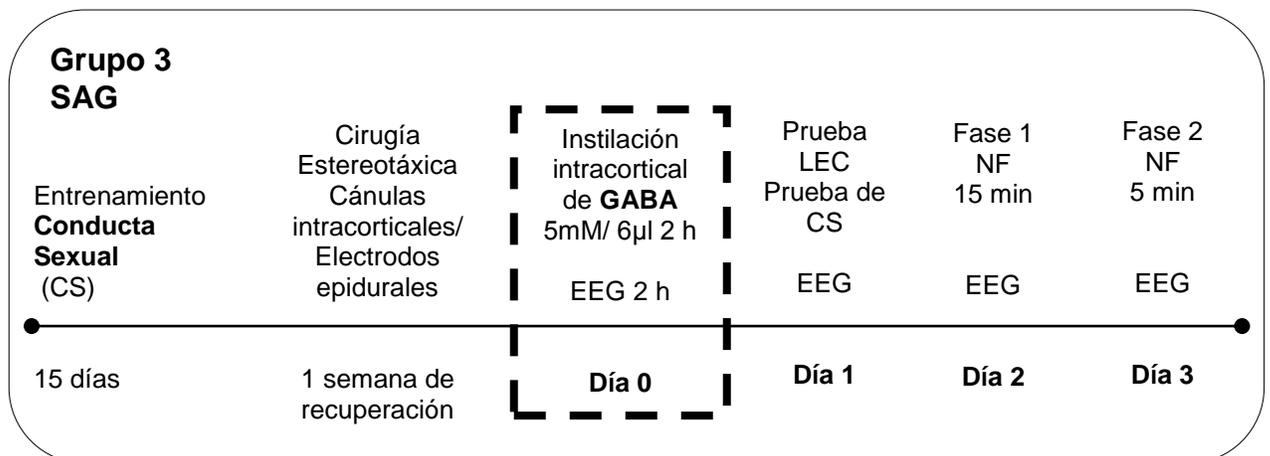
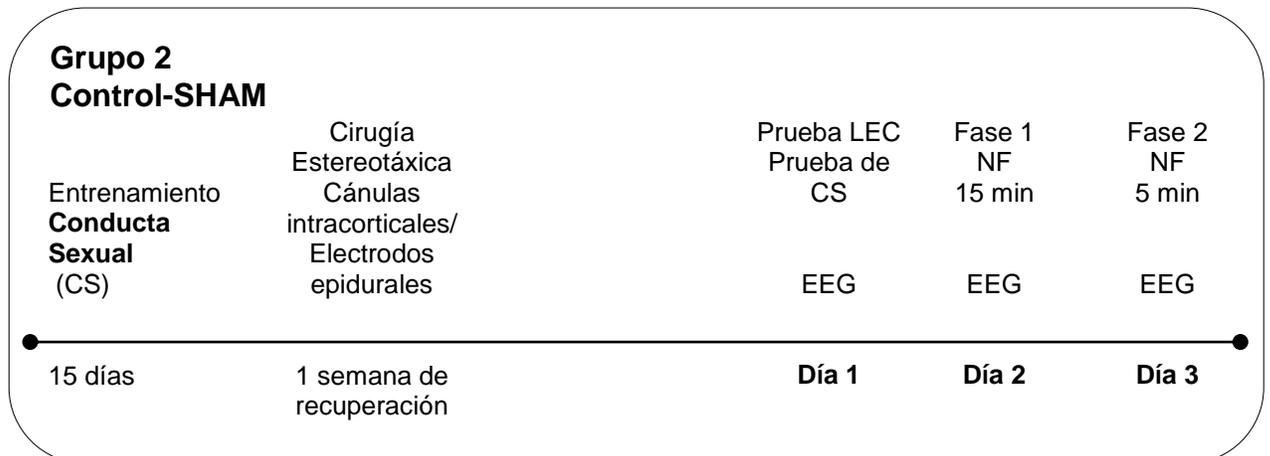
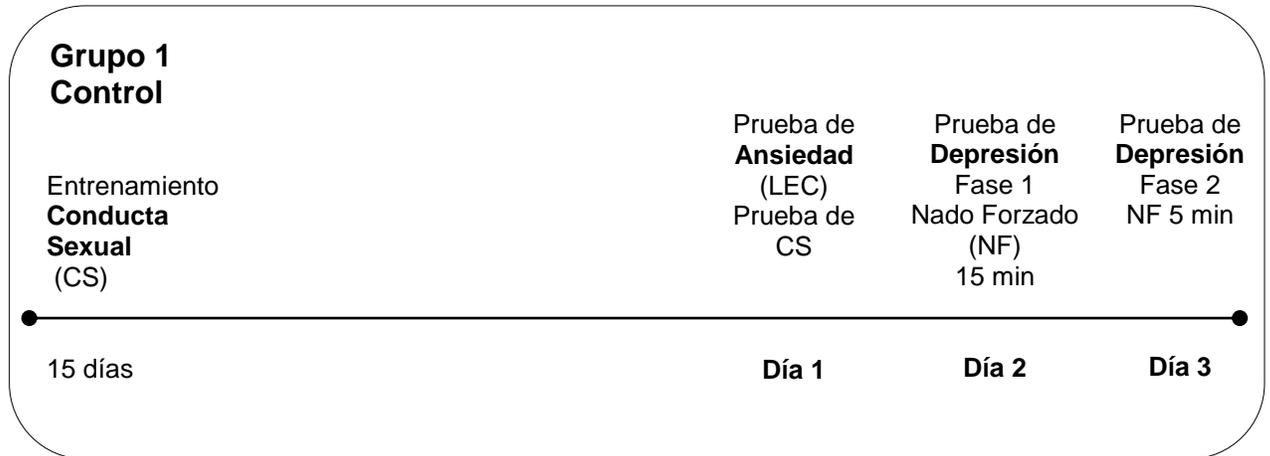
$$\frac{tBx}{tBx + tBy} \times 100$$

Donde t es el tiempo y x es el brazo en el que ha permanecido, se continuó la misma ecuación para el número de entradas.

En la prueba de conducta sexual se cuantificaron y analizaron el promedio del número de montas, de intromisiones y la duración de la serie copulatoria. En la prueba del NF, se evaluaron el número de eventos de las 3 conductas (nado, trepado e inmovilidad) en periodos de 5 segundos.

Los resultados EEG se analizaron en bloques de 30 min; se cuantificaron el número de complejos espiga-onda y la potencia mediante el análisis de frecuencia de Wavelets, el análisis estadístico se llevó a cabo con una prueba ANOVA de una vía, comparando intra-grupos (*) y entre-grupos (&) con un valor de $p \leq 0.05$ con una prueba *Post Hoc*: Tukey. La evolución electrofisiológica del SAG se consideró como un estudio longitudinal de 10 días, se evaluaron: la potencia y el número de complejos espiga-onda, entre las dos Cx (& la que recibió instilación intracortical de GABA y la contralateral), así como con el día previo a la instilación (*) con una análisis estadístico ANOVA *Post Hoc*: Tukey. Los datos EEG obtenidos se analizaron y graficaron con el programa y SigmaPlot 11.0.

Diagrama del método



Continuación...

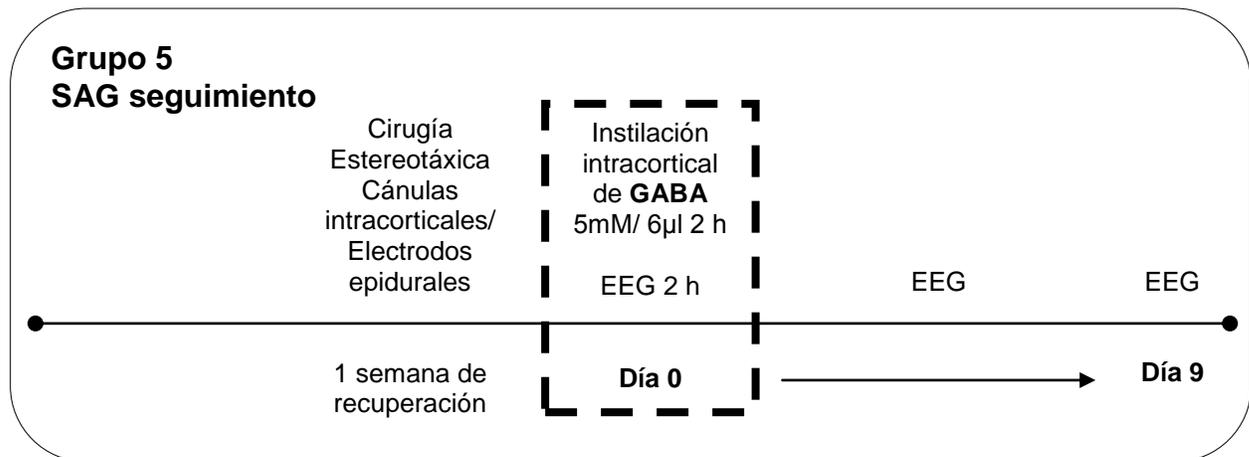
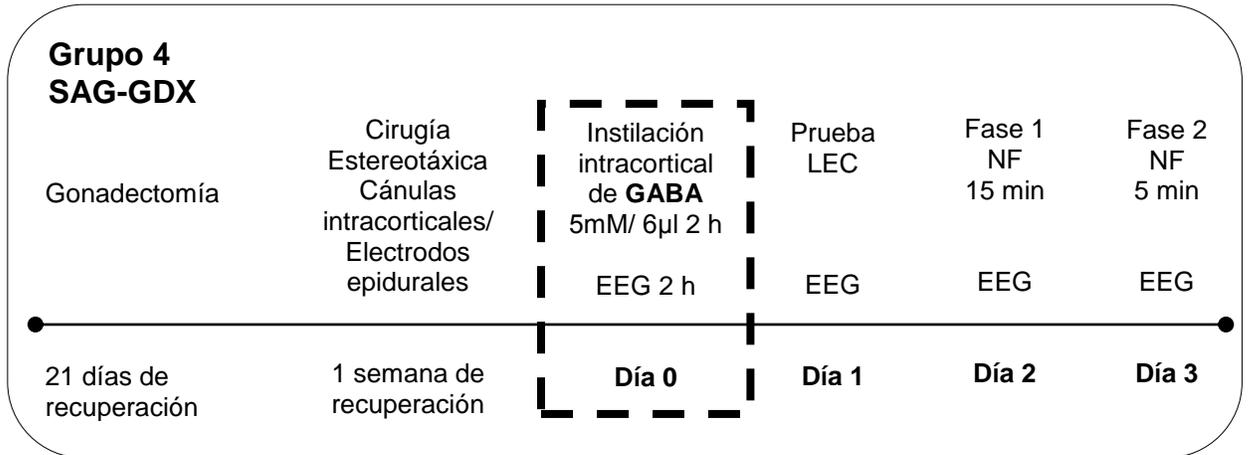


Figura 6. Esquema del diseño experimental para los grupos de trabajo.

VI. Resultados

Análisis Electrofisiológico del SAG

El primer planteamiento de esta tesis fue realizar un análisis EEG que identifique a la hiperexcitabilidad neuronal causada por el SAG, analizando el número de complejos espiga-onda y la potencia de la actividad EEG. Para ello utilizamos el análisis Wavelets el cual nos permitió realizar un seguimiento electrofisiológico de una señal aleatoria desde una descripción matemática. Debido a que en un electroencefalograma de hiperexcitabilidad neuronal no existe una función o relación formal que lo describa, de manera que para aplicar algoritmos de análisis numéricos, es necesario utilizar series del tiempo o métodos estadísticos (Fernández-Más, 1998).

En la Figura 7, identificamos la transformación cuantitativa que tiene la señal del EEG antes, durante y después de la inducción de la abstinencia a GABA. El análisis de la frecuencia de 4-20 Hz mostró una actividad basal con predominio de ondas rápidas de pequeña amplitud. La cual se identificó con colores azules y verdes (grupo control-SHAM). En contraste, fue posible cuantificar en el grupo con SAG un incremento de la actividad EEG por la aparición de complejos espiga-onda, características de las abstinencias a drogas GABAérgicas, que previamente se había publicado en los trabajos de Brailowsky et al. (1988); el SAG es una manifestación electrofisiológica caracterizada por complejos rápidos de gran amplitud asociados a trenes de descarga de mayor voltaje en la zona instilada, esta actividad en el análisis de Wavelets se cuantificó como una fase de color rojo-amarillo en su expresión gráfica.

El seguimiento de la evolución de la actividad EEG por diferentes días mostró como gradualmente desaparece el color rojo, para reaparecer los colores fríos. Nótese que en la expresión gráfica del fenómeno de la figura 7, la actividad epileptiforme tiene aumento en la frecuencia de 5-10 Hz; se puede observar que el color rojo tiene mayor aparición en esta banda.

Espectros de Frecuencia de la Corteza Somatomotora durante el SAG

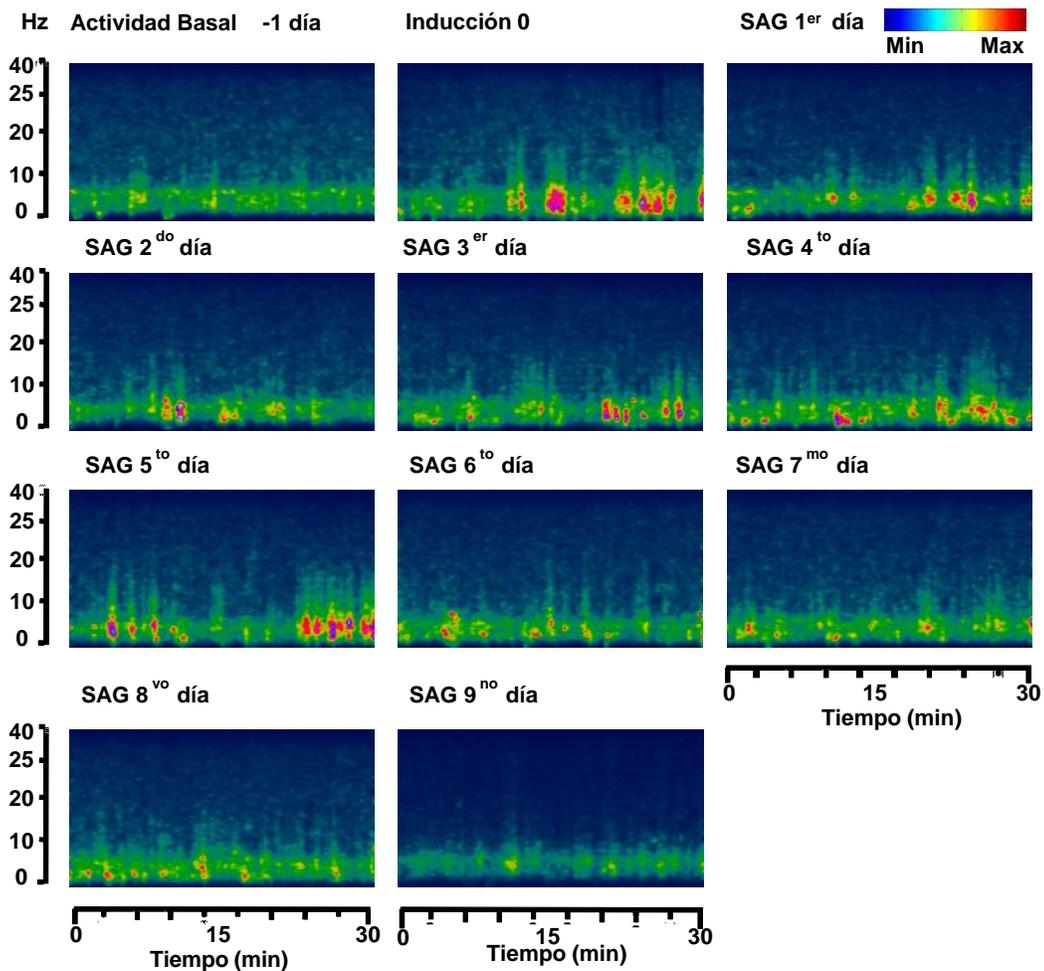


Figura 7. Espectros de frecuencia representativos de la Cx somatomotora instilada, seguimiento de registro electrofisiológico de 10 días. El aumento de la potencia se refleja en la aparición de color rojo (máx), mientras que en menor actividad predomina el color verde-azul (min, barra superior derecha). Nótese que la actividad se encuentra incrementada los primeros días de abstinencia (*días 0 y 1*), condición que se reduce gradualmente hasta regresar a los colores a verde-azules (*día 9*).

La potencia promedio del EEG antes de la manipulación farmacológica fue de $476 \pm 6.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio instilado y de $342.5 \pm 4. \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ en el hemisferio contralateral ($n=5$ en ambas cortezas). Al realizar el análisis cuantitativo del espectro de frecuencia de 4-20 Hz en ambos hemisferios cerebrales durante el SAG se demostró que la potencia tuvo un incremento semejante en las dos cortezas cerebrales el día de inducción (182%; *día 0* de

la Figura 8), en el hemisferio instilado (derecho; círculos negros) fue de $771.9 \pm 9.1 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ y en el contralateral fue de $696.7 \pm 9.5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ (izquierdo; círculos blancos), con una diferencia significativa comparada con el registro de la línea base ($p \leq 0.001$). Este efecto disminuye gradualmente en la evolución temporal de la abstinencia. Es importante indicar la persistencia de una asimetría en el registro EEG después de la inducción del SAG: la potencia del registro es significativamente mayor en el hemisferio instilado comparado con el hemisferio contralateral ($p \leq 0.001$).

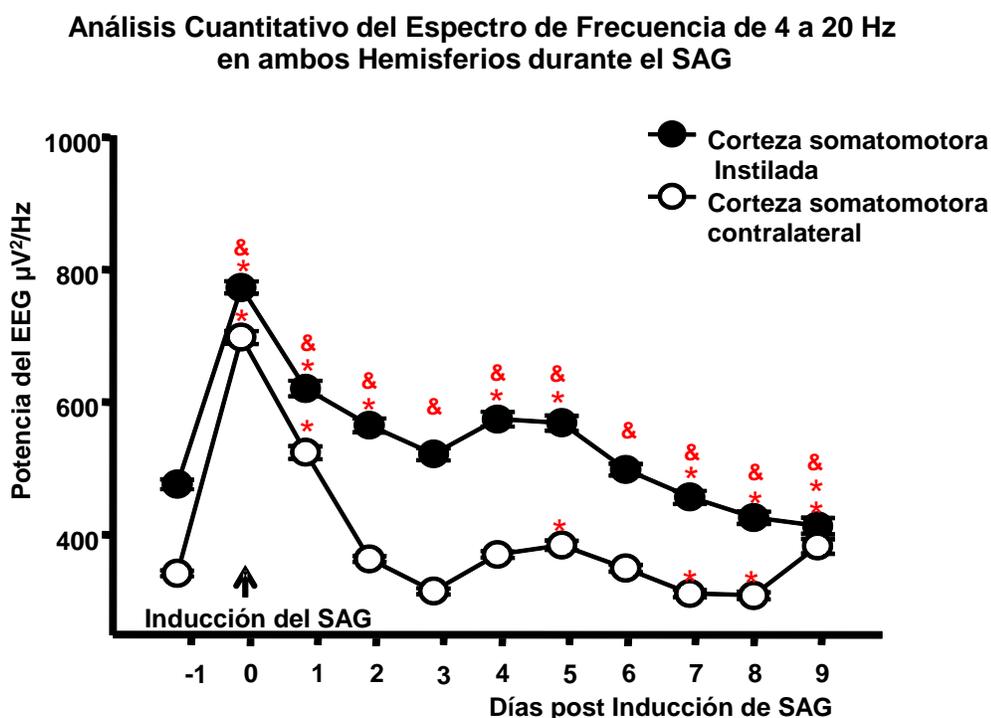


Figura 8. Análisis cuantitativo del SAG en su espectro de frecuencia (4-20 Hz/30 min) durante 10 días. Inducción del SAG indicada con una flecha negra. Se muestra el cambio en la potencia ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) del EEG. Cx somatomotora instilada con GABA (círculos negros, ●; $n=5$) y Cx somatomotora contralateral (círculos blancos, ○; $n=5$). Media \pm Error estándar (EE). ANOVA Post Hock Tukey (* $p \leq 0.05$ intra-grupos, & $p \leq 0.05$ entre-grupos).

Además de analizar el incremento en la potencia del EEG que genera el SAG, se cuantificó el número de complejos espiga-onda de alta frecuencia y de gran amplitud que caracterizan a fenómenos de hiperexcitabilidad neuronal como las epilepsias.

En la figura 9 se muestran trazos EEG en tres condiciones del experimento, el primero corresponde a la actividad eléctrica sin manipulación farmacológica (*día -1*, figura 9 A). El segundo (figura 9 B) indica el cambio en actividad basal tras la aparición de complejos espiga-onda el día de inducción del SAG (*día 0*), a partir de este criterio se midió la latencia a primera espiga (15 ± 2 min), el conteo de espigas mostró que se manifestaron 2190 ± 140 en el hemisferio instilado (Figura 9 inferior; círculos negros; $p \leq 0.001$). El tercer trazo se obtuvo del noveno día de registro EEG, el cual muestra que el número de espigas se redujo hasta alcanzar valores basales (figura 9 C).

Después de la inducción del SAG, el número de los complejos espiga-onda en el hemisferio instilado se mantuvo durante los 6 días posteriores (1360 ± 10 , Figura 9, círculos negros, días 1- 6; $p \leq 0.001$); los días 7-8 el número de complejos espiga-onda se redujo (660 ± 180 y 480 ± 130 respectivamente), es importante mencionar el número de espigas cuantificado en los días 8 y 9 cumplen con valores identificados en el día -1, es decir que la actividad epileptiforme generada por el SAG tiene un efecto reversible.

A diferencia de lo que sucede en el hemisferio derecho, la corteza contralateral sólo tuvo un incremento en el número de complejos espiga-onda el día 0 (1290 ± 110 ; Figura 9; círculos blancos; $p \leq 0.001$) y es evidente una disminución súbita de la actividad epileptiforme a partir del día 1 del SAG, sin mostrar diferencias significativas con respecto a la línea base.

Esta serie de resultados demostró que el SAG: **1)** tiene un comportamiento electrofisiológico en el cerebro tendiente a hiperexcitabilidad neuronal (aumento de la potencia, aparición de complejos espiga-onda y latencia de ~ 15 min) con disminución paulatina hasta regresar a valores control a partir del 8^{vo} día y **2)** la actividad epiléptica del hemisferio instilado se propaga al hemisferio contralateral.

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

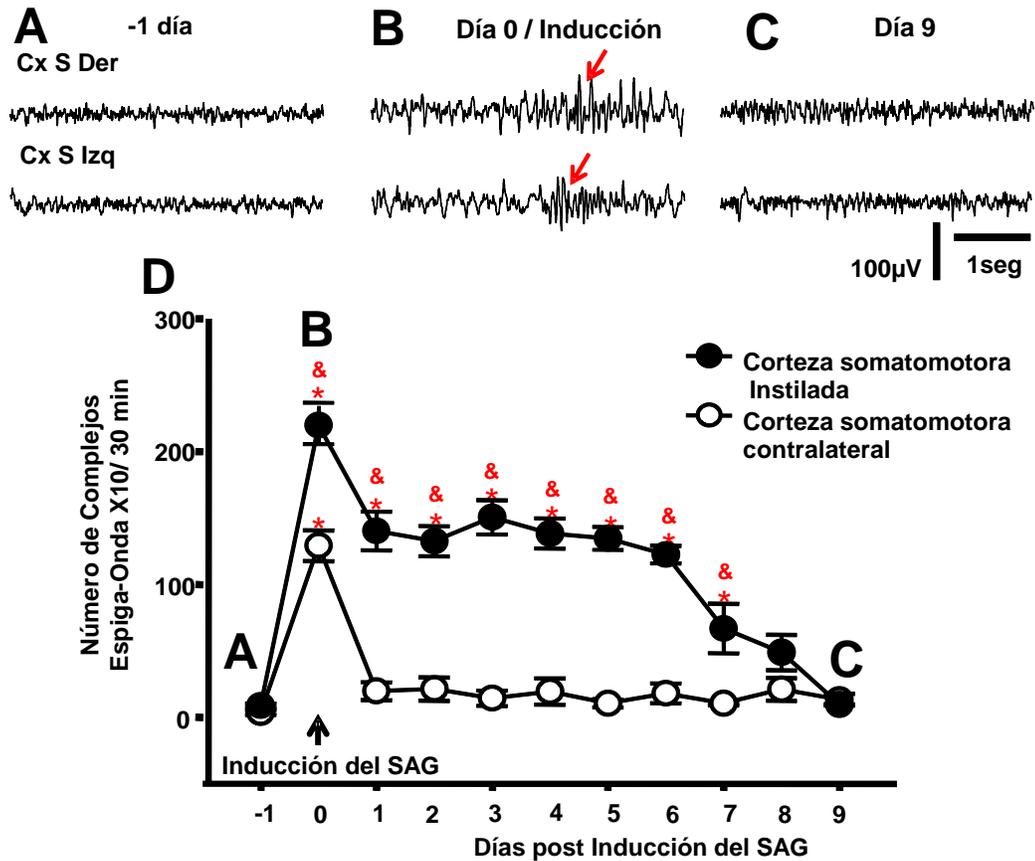


Figura 9. Trazos EEG representativos en tres fases del experimento y cuantificación de complejos espiga-onda. En **A** se aprecia la actividad EEG basal (*día -1*), en **B** es evidente la aparición de complejos espiga-onda el día de inducción del SAG (*día 0*) y en **C** se expone la ausencia de actividad epileptiforme en el EEG el 9^{no} día después del SAG. La escala muestra 1 seg y 100 µV. (Cx S: corteza somatomotora, Der: derecha- instilada, Izq: izquierda- contralateral). En **D** se comparan cuantitativamente los complejos espiga-onda de la Cx somatomotora instilada (círculos negros, ●; n=5) y de la Cx somatomotora contralateral (círculos blancos, ○; n=5). Media ± Error estándar (EE) ANOVA Post Hoc Tukey (*p≤0.05 intra-grupos; &≤0.05 entre-grupos)

Efecto de la Gonadectomía en la Hiperexcitabilidad Neuronal inducida por el SAG

Los siguientes resultados se obtuvieron en la búsqueda de identificar el efecto de la ausencia de las hormonas sexuales androgénicas en los cambios de la excitabilidad neuronal y su impacto en las conductas de estudio de esta tesis.

Como se demostró anteriormente, los animales macho son susceptibles de generar un SAG con una latencia corta (~15 min) y una duración larga (~8 días). Sin embargo, se conoce el efecto de la GDX en el inicio de la abstinencia a GABA. Estudios previos demostraron que las hormonas esteroides masculinas como la T y la DHT son agentes moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A; y que pueden disminuir la excitabilidad cerebral dependiendo de su concentración. Es conocido en el campo de las neurociencias que la T incrementa la corriente de cloro dependiente de GABA y reduce las corrientes de Ca²⁺ (Martín-García et al., 2007; Schumacher et al., 2003).

Para confirmar que la cirugía estereotáxica no tuvo efecto en la actividad EEG basal de las ratas macho, un grupo de animales a los que solo se les implantaron cánulas/electrodos de registro, se les evaluó EEG y se obtuvo el espectro de frecuencia de Wavelets, el cual mostró que la actividad del EEG se mantuvo con una frecuencia de la banda 4-10 Hz que corresponde a colores azules-verdes en la expresión gráfica (Figura 10 A), este resultado muestra que la cirugía estereotáxica y la cicatriz quirúrgica no modificó la actividad basal del EEG.

A los animales con GDX (n=8), se les instiló GABA en la corteza somatomotora derecha (5mM/ 6µl, 2h); el análisis del Wavelets mostró que éstos son igualmente susceptibles de generar hiperexcitabilidad cortical por la abstinencia a GABA que los animales sexualmente expertos (Figura 10 C y B, respectivamente), es de hacerse notar que el aumento en la potencia, observable en la expresión gráfica, es principalmente en la banda de 5 a 10 Hz.

Contrastando los datos anteriores, al hacer el análisis cuantitativo de la potencia del EEG en los grupos con SAG sexualmente expertos y SAG-GDX, se identificó que las ratas GDX tienen mayor potencia de la actividad EEG el día previo a la instilación ($719.3 \pm 5.5 \mu V^2/Hz$, día -1), este valores significativamente mayor con respecto a las ratas macho sexualmente expertas

($587.3 \pm 3.4 \mu V^2/Hz$; Figura 11 A y B, día -1; $p \leq 0.001$); es decir, que la actividad basal del EEG de los animales GDX se incrementa por la ausencia de hormonas sexuales masculinas.

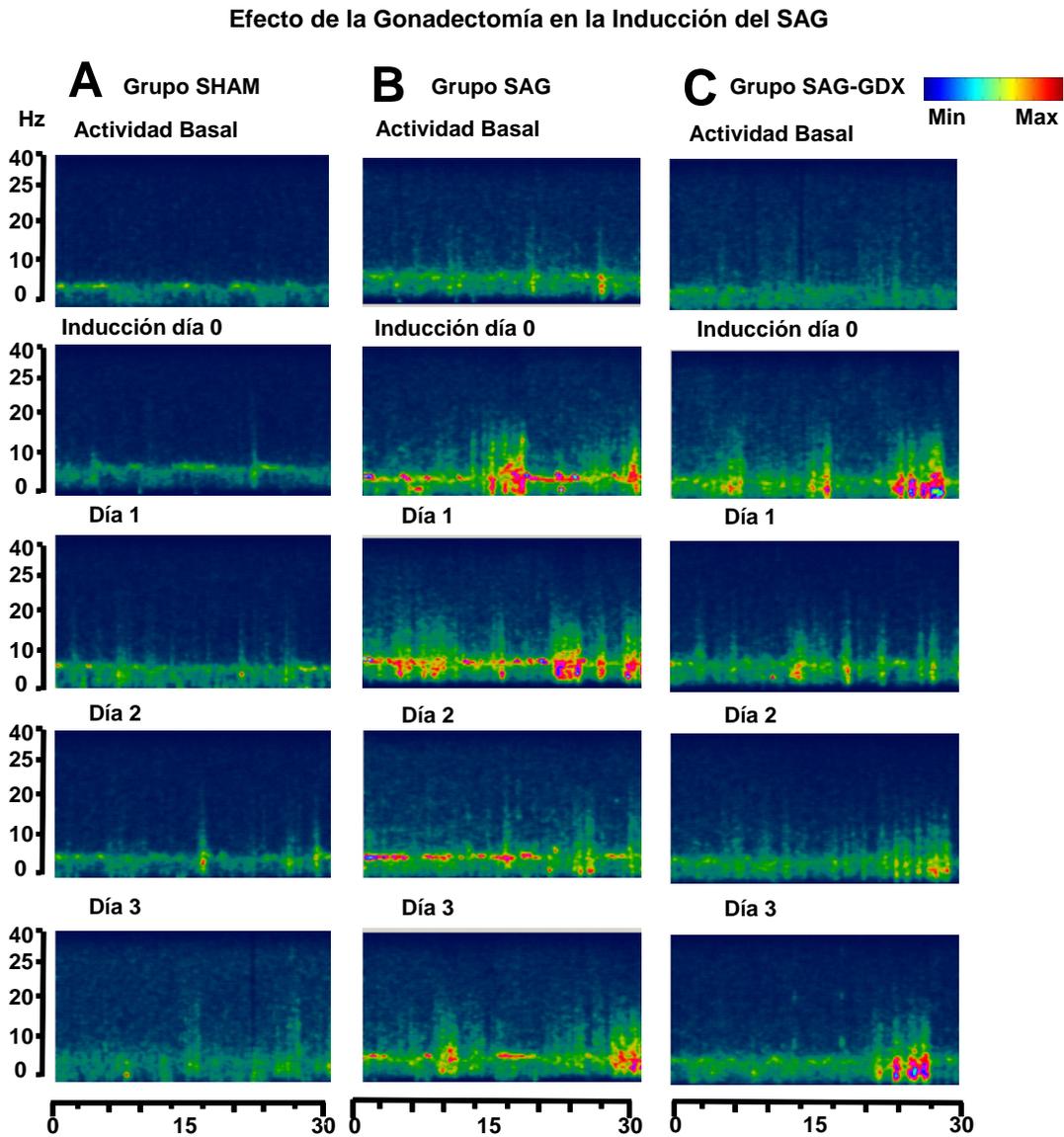


Figura 10. Gráfica del análisis de la potencia de la Cx somatomotora instilada de ratas macho. Nótese que el aumento en la potencia en los estadios iniciales del SAG se refleja en la aparición de color rojo (max), mientras que en menos actividad cortical predomina el color verdeazul (min, barra superior derecha). En **A**, línea izquierda, se muestran los espectros representativos de un animal sin manipulación farmacológica (**Control-SHAM**). En **B**, línea central, espectro representativo del SAG en un macho sexualmente experto (**SAG**). En **C**, línea derecha, se muestra el espectro de un macho gonadectomizado (**SAG-GDX**).

El día de inducción del SAG (*día 0* en la Figura 11), la potencia promedio del EEG fue de $1337.7 \pm 8.6 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ para el grupo de machos GDX (Figura 11 A, cuadros negros; $n=8$; $p \leq 0.001$); el cual representa un 185% de incremento comparado con el registro EEG control. A diferencia de este resultado, al grupo con SAG de ratas macho sexualmente expertas se le cuantificó una potencia de $934.9 \pm 6.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$, lo que equivale a un incremento del 159% sobre la línea base (Figura 11 A, triángulos grises oscuros; $n=12$; $p \leq 0.001$); es decir, que la expresión de hiperexcitabilidad neuronal de los animales GDX es estadísticamente significativa mayor comparada con la registrada en los animales sexualmente expertos. La evolución temporal de la actividad epileptiforme inducida por el SAG disminuye paulatinamente (Figura 11 A y B, triángulos grises oscuros y cuadros negros) en ambos grupos.

Es importante mencionar que el día 2 del SAG, la potencia del EEG de los animales sexualmente expertos disminuyó ($580.5 \pm 2.5 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$), tanto así que este valor fue muy similar al registrado en la actividad control ($587.3 \pm 3.4 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; Figura 11; triángulos grises oscuros). El análisis electrofisiológico del hemisferio contralateral a la instilación de GABA, identificó que existe un aumento en la potencia del EEG de 154% ($1291.1 \pm 7.1 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$) en el grupo de animales GDX (Figura 11 B, cuadros negros; $n=8$; $p \leq 0.001$), el cual presentó diferencias estadísticamente significativas con el grupo de animales sexualmente expertos cuyo incremento fue de 130% ($760.2 \pm 11.4 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$; Figura 11 B, triángulos grises oscuros; $n=8$; $p < 0.001$).

Este análisis muestra que la Cx somatomotora a la que se le indujo el SAG es la que presenta mayor potencia y que el fenómeno se propaga a la Cx contralateral, principalmente el día de inducción en ambas condiciones (GDX y sexualmente expertos).

**Análisis Cuantitativo de la potencia del EEG en ambos Hemisferios durante el SAG:
Papel de la Gonadectomía**

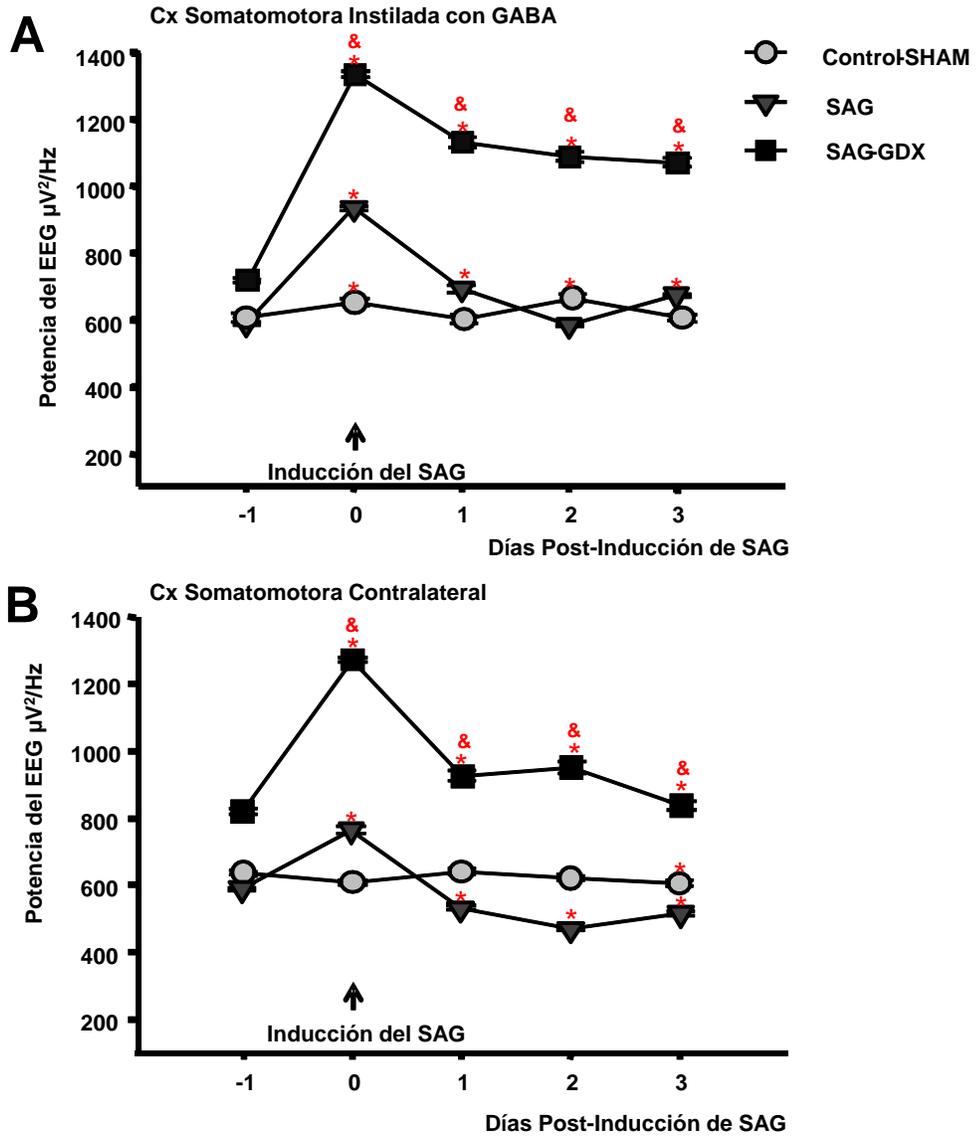


Figura 11. Análisis cuantitativo de la potencia del EEG en la banda 4-20 Hz/30 min. Inducción del SAG indicado con una flecha negra. Se muestra el análisis de la potencia ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) del EEG, en **A** la Cx somatomotora instilada y en **B** la Cx somatomotora contralateral. Grupos: **Control-SHAM**, ratas macho sexualmente expertas sin manipulación farmacológica (círculos grises, ○; n=5), **SAG** ratas macho sexualmente expertas con SAG (triángulos invertidos grises oscuro, ▼; n=12), **SAG-GDX** ratas gonadectomizadas con SAG (cuadros negros, ■; n=8). Media \pm E.E. ANOVA Post Hock Tukey (* $p \leq 0.05$ intra-grupos, & $p \leq 0.05$ entre-grupos)

Al observar los trazos de la actividad EEG obtenidos del grupo control-SHAM (Figura 12 A) se identificó que la actividad eléctrica se mantiene durante los 5 días de seguimiento. En la figura 12 B y C se muestran los trazos representativos de un animal sexualmente experto y otro de un animal GDX en tres condiciones del experimento, cabe recalcar que la actividad EEG basal es visiblemente mayor en los animales GDX. Es evidente que el día de inducción (*día 0*) la actividad eléctrica se modifica, para dar paso a la aparición de complejos espiga-onda, que se mantiene el día 1 posterior a la inducción.

El inicio de la actividad epileptiforme se cuantificó en 15.1 ± 1.4 min para el grupo SAG-GDX, en cambio en el grupo SAG fue de 13.3 ± 1.2 min.; esta diferencia no es estadísticamente significativa, con lo anterior queda de manifiesto que la latencia de la abstinencia al GABA no se modifica por la ausencia de hormonas sexuales masculinas.

El análisis del conteo de complejos espiga-onda en las primeras horas de la abstinencia a GABA entre ambos grupos evidenció que: **1)** los animales sexualmente expertos mostraron en promedio 2610 ± 90 espigas el día de inducción (*día 0*; Figura 13 A; cuadros negros; $p \leq 0.001$) y **2)** el grupo de animales GDX tuvieron 2480 ± 38 espigas (*día 0*; Figura 13 A; triángulos grises oscuros; $p \leq 0.001$); es decir, la manifestación inicial del SAG no se modifica por la ausencia de hormonas sexuales.

Es importante mencionar que la evolución electrofisiológica de la hiperexcitabilidad neuronal 24 h después de la inducción de la abstinencia es estadísticamente diferente entre los animales SAG íntegros y GDX ($p \leq 0.001$), el primer grupo de animales tienen un mayor número de espigas 2210 ± 380 ($p \leq 0.001$), en contraste con el grupo SAG-GDX al que se le cuantificaron 1430 ± 100 complejos epileptiformes ($p \leq 0.001$). Este fenómeno se invierte 48 h después de la inducción del SAG; el EEG de los animales sexualmente expertos se le cuantificaron 450 ± 40 complejos espiga-onda, en cambio, al EEG

del grupo de animales SAG-GDX se le identificaron 1650 ± 140 (triángulos grises oscuros y cuadros negros, respectivamente; Figura 13 A; $p \leq 0.001$)

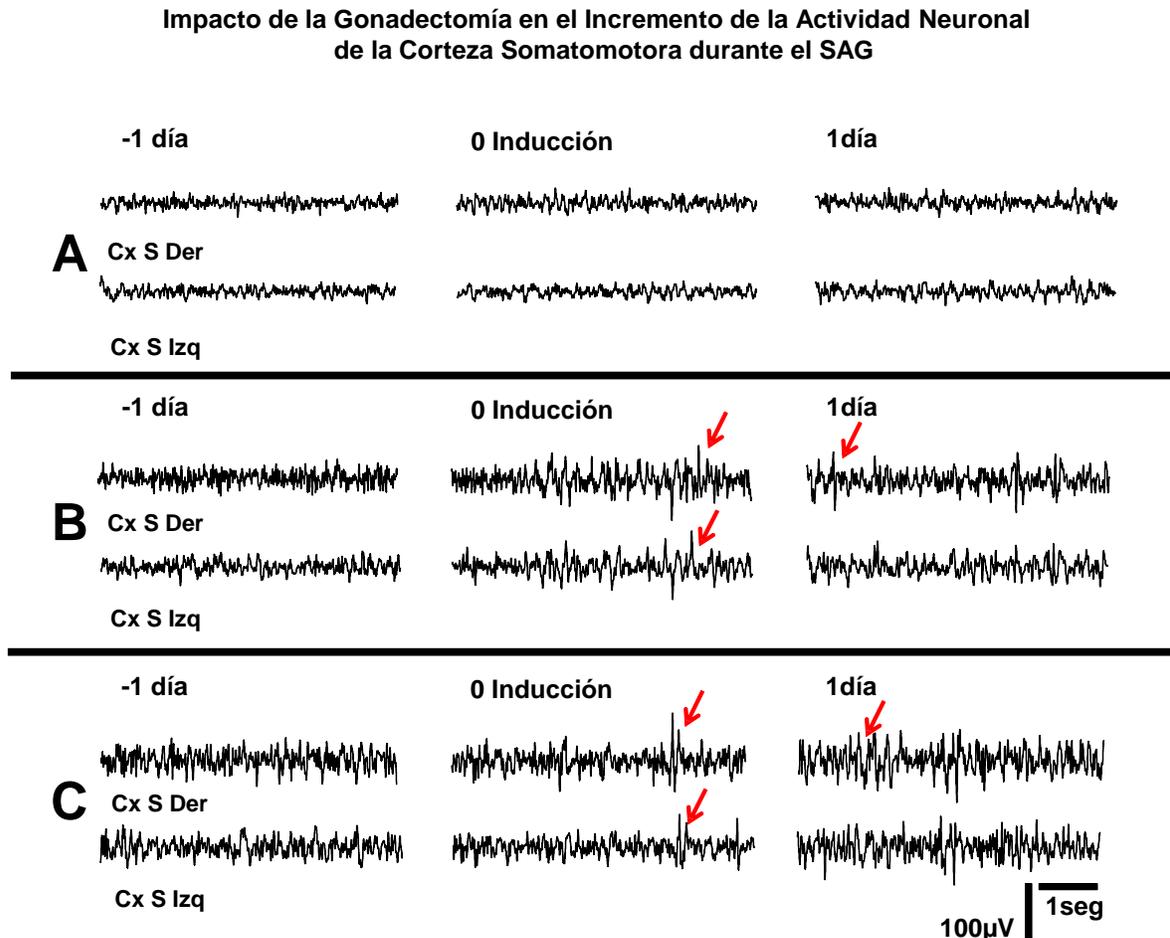


Figura 12. Trazos EEG representativos en diferentes fases del experimento. En **A** se observa la actividad eléctrica basal (**Control-SHAM**) en 3 días distintos, en **B** es evidente la presencia de complejos espiga-onda característicos de la inducción del SAG (*día 0*) y del día posterior al SAG (*día 1*) en el grupo **SAG**, en **C** se aprecia la actividad epileptiforme inducida por el SAG en machos gonadectomizados (**SAG-GDX**). La escala muestra 1 seg y $100 \mu V^2/Hz$. (Cx: corteza, S: somatomotora, der: derecha-instilada, izq: izquierda-contralateral).

El tercer día después de la inducción del SAG se cuantificaron 1360 ± 50 complejos espiga-onda en el grupo de ratas sexualmente expertas y 1430 ± 100 complejos epileptiformes en el grupo SAG-GDX, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 13 A).

Los datos anteriores muestran que la evolución temporal de la hiperexcitabilidad neuronal tiene una considerable disminución dos días después de la inducción de la abstinencia en los animales sexualmente expertos, este fenómeno electrofisiológico coincide con el día posterior a la ejecución de la conducta sexual. No obstante que vamos a analizar este punto ampliamente en la sección de discusión de esta tesis, estos resultados sugieren que el incremento transitorio de andrógenos inducidos por la ejecución de la conducta sexual, pueden modular positivamente al receptor GABA_A, lo cual explica la disminución del número de complejos espiga-onda durante el segundo día de la abstinencia (Figura 13 A).

Como previamente ya se había identificado en esta tesis, el hemisferio contralateral tiene una propagación de la actividad epileptiforme de la abstinencia (Figura 11). Los animales sexualmente expertos con SAG presentaron un perfil de hiperexcitabilidad cortical semejante en el hemisferio contralateral en cuanto al incremento del número de complejos espiga-onda comparado con el hemisferio instilado ($p \leq 0.001$). De esta manera, en la evolución temporal del SAG del hemisferio contralateral en los animales sexualmente expertos se cuantificaron 1200 ± 60 complejos espiga-onda (Figura 13 B, triángulos invertidos; $p \leq 0.001$); esta hiperexcitabilidad neuronal se mantuvo 24 h después de la inducción (1500 ± 110 complejos espiga-onda; $p \leq 0.001$), en analogía con el hemisferio instilado el número de espigas epilépticas disminuyó a 110 ± 10 el segundo día después de la inducción del SAG. Asimismo, al tercer día de evolución de la abstinencia, el número de complejos epileptiformes a volvió incrementarse significativamente (1360 ± 50 ; $p \leq 0.001$). En contraste, los animales GDX tuvieron incremento significativo del número de complejos espiga-onda el día de la inducción (1270 ± 20 ; $p \leq 0.001$) y 3 días después haber iniciado el SAG (1050 ± 110 ; $p \leq 0.01$).

Efecto de la Gonadectomía en el Aumento de la Actividad Neuronal de la Corteza Somatomotora durante el SAG

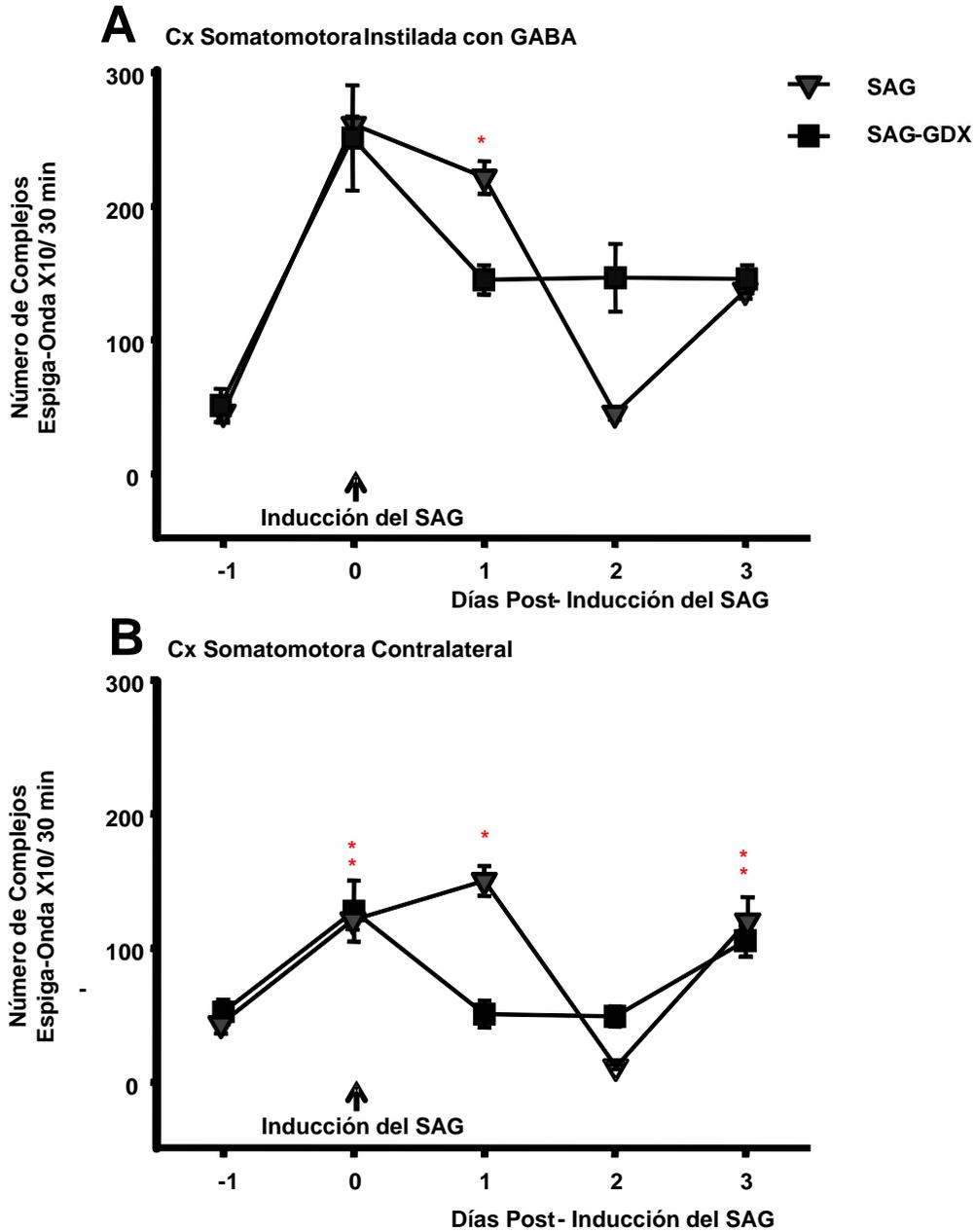


Figura 13. Análisis del número complejos espiga-onda durante el SAG. Inducción del SAG indicado con una flecha negra. Se muestran, en **A** la Cx somatomotora instilada (derecha) y en **B** la Cx somatomotora contralateral. Grupos: **SAG**, en ratas macho sexualmente expertas (triángulos invertidos grises oscuro, ▽; n=12); **SAG-GDX**, machos gonadectomizados con SAG (cuadros negros, ■, n=8). Media ± E.E. ANOVA Post Hoc Tukey (*p≤0.05 intra-grupos, &p≤0.05 entre-grupos)

Medición de la Ansiedad en el Estadio Inicial del SAG

El LEC es una prueba cuantitativa para la medición de la ansiedad en roedores, en la presente tesis fue utilizada para evaluar con detalle la conducta de ansiedad que acompaña a la abstinencia a GABA en los primeros estadios. Se obtuvo el porcentaje del tiempo de permanencia en los BC y los BA; así como, el número de entradas en cada uno de estos brazos. Debido a la premisa de que la abstinencia a una droga GABAérgica genera ansiedad, el objetivo en esta parte de la tesis fue identificar si el SAG puede inducir un perfil ansiogénico en ratas macho sexualmente expertas y en ratas GDX.

Los resultados indicaron que los animales del grupo control (n=12) tuvieron un mayor número de entradas a los BC (4.6 ± 0.7 , Figura 16 C; barras blancas) en relación al número de entradas a los BA (3.1 ± 0.4); el tiempo de permanencia para cada uno de los brazos tiene de un perfil semejante, para los BC se encontró un $61 \pm 6\%$ discretamente mayor que en los BA de $38 \pm 6\%$ (Figura 16 B y D; barras blancas); es decir, el grupo control no manifestó ansiedad.

El grupo de animales control-SHAM (animales con cirugía estereotáxica sin manipulación farmacológica), tuvo un perfil semejante al grupo de animales control (barras grises claro, Figura 16 A-D). Este resultado indica que la cirugía estereotáxica para la implantación de cánulas/ electrodos no indujo cambios en el perfil de ansiedad de las ratas.

En contraste a lo identificado en los grupos anteriores, el grupo de animales sexualmente expertos con SAG, presentó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de tiempo de permanencia en los BA, el cual se ve reducido (16 ± 3.7 ; $p \leq 0.01$; ANOVA Post Hoc Dunette, barras grises oscuros, Figura 14 B), el porcentaje del tiempo de permanencia en los BC se incrementó (83.7 ± 4.9 ; $p \leq 0.01$); esto sugiere un perfil de ansiedad en los animales con abstinencia a GABA. No obstante, el número de entradas

hacia los BA y los BC mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando fueron comparadas con el grupo control.

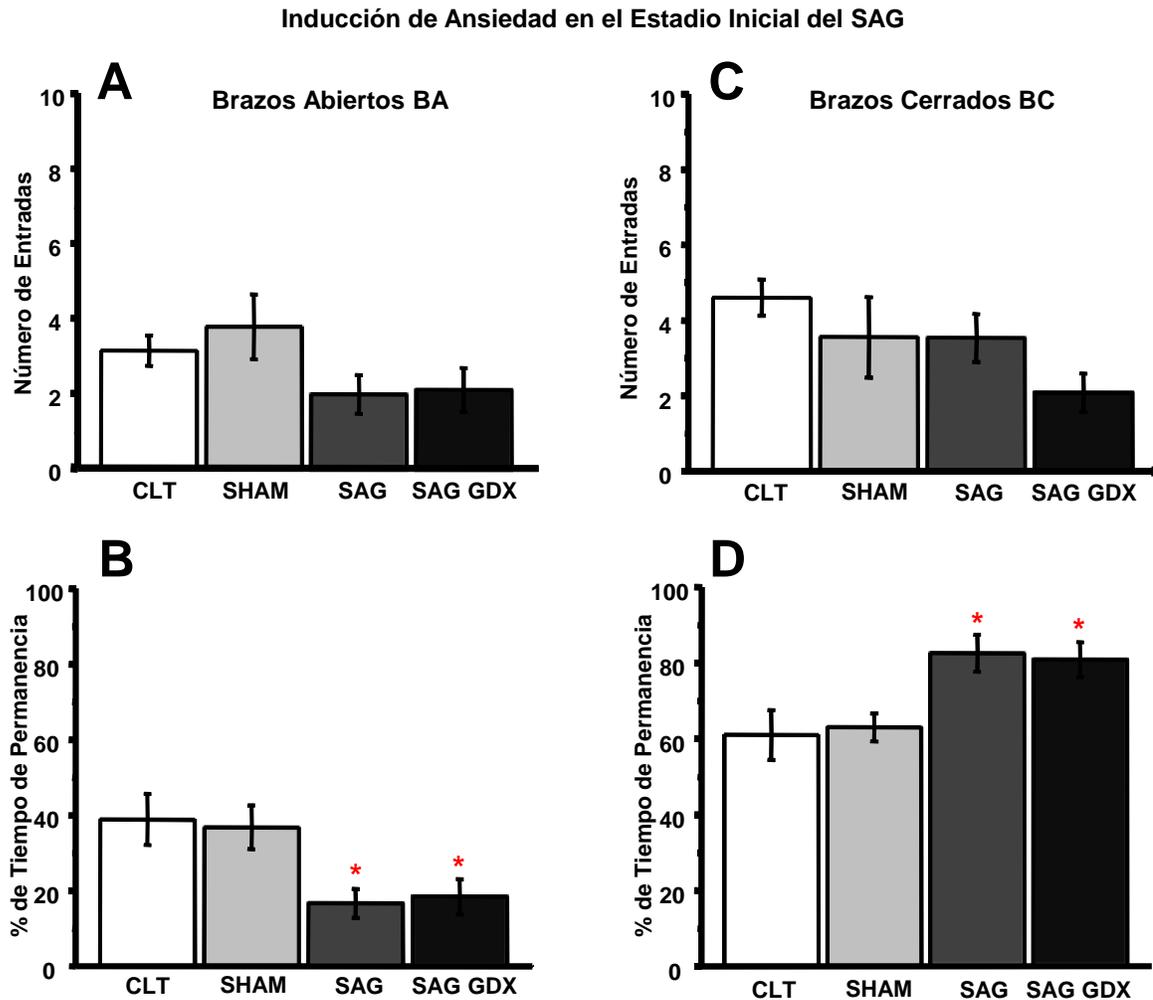


Figura 14. La prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC) se realizó para la medición de ansiedad. En esta prueba, mayor tiempo de permanencia en BC asociado con menor tiempo en BA indica un perfil ansioso. En A y B, se grafica el número de entradas así como el porcentaje de tiempo de permanencia en BA; en C y en D se observa el número de entradas así como el porcentaje de tiempo de permanencia en BC. Nótese que ambos grupos de animales con SAG presentan ansiedad. Grupos: **CONTROL** (barras blancas, n=12), **Control-SHAM** (barras grises, n=5), **SAG** (barras grises oscuro, n=12) y **SAG-GDX** (barras negras, n=8). Media± E.E. ANOVA Post Hoc: Dunette ($p \leq 0.05$)

Finalmente, el análisis del grupo SAG-GDX evidenció un perfil semejante al que tuvo el grupo de los animales sexualmente expertos con SAG: aumento en el tiempo de permanencia en los BC ($82\pm 4\%$; $p\leq 0.05$) y disminución en el porcentaje del tiempo de permanencia en los BA (18 ± 4 ; $p\leq 0.05$, Figura 16 A y C, barras negras). El número de entradas a los BA y los BC no se vio afectado por la abstinencia (Figura 16 B y D, barras negras). Cabe recalcar que el SAG induce un perfil ansiogénico a pesar de diferencia en la influencia hormonal.

Disminución de la Conducta Sexual en el Estadio Inicial del SAG

Las ratas macho sexualmente activas tienen un entrenamiento durante un periodo de 15 días que se repite cada 2 días en sesiones de 30 minutos con ratas hembra sexualmente maduras, que expresan actividad lordótica y conductas proceptivas ante la presencia de los machos. Para esta tesis, la evaluación de la conducta sexual se realizó 24 h después de haberse iniciado el SAG, los resultados obtenidos a partir de su registro fueron: **1)** el número de montas, **2)** el número de intromisiones y **3)** la duración de la serie copulatoria, teniendo como límite un periodo de 30 minutos.

El número promedio de montas de las ratas macho del grupo control ($n=12$) fue de 2.5 ± 0.8 eventos. En este mismo grupo, el número cuantificado de intromisiones fue de 21 ± 2 . Asimismo, la duración de la serie eyaculatoria promedio de este grupo fue de 519 ± 71 segundos (Figura 15 A-C, barras blancas).

La actividad sexual de las ratas macho con cirugía pero sin SAG (control- SHAM; $n=5$) no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control descrito anteriormente. El número de montas fue de 4.2 ± 0.8 ; el número de intromisiones 25 ± 5 y en la relación a la duración de la serie copulatoria el tiempo invertido fue de 437 ± 52 segundos (barras grises claras Figura 15 A-C).

A los animales con SAG les fue cuantificado un número de montas (5 ± 1) e intromisiones (24 ± 2) semejante al de los grupos control; sin embargo, tuvieron un cambio en la actividad sexual con respecto a la duración de la serie copulatoria la cual fue de 801 ± 105.9 segundos ($p\leq 0.05$). La cuantificación de la duración de la serie copulatoria tuvo un incremento de 154%.

Disminución de la Conducta Sexual durante el Estadio inicial del SAG

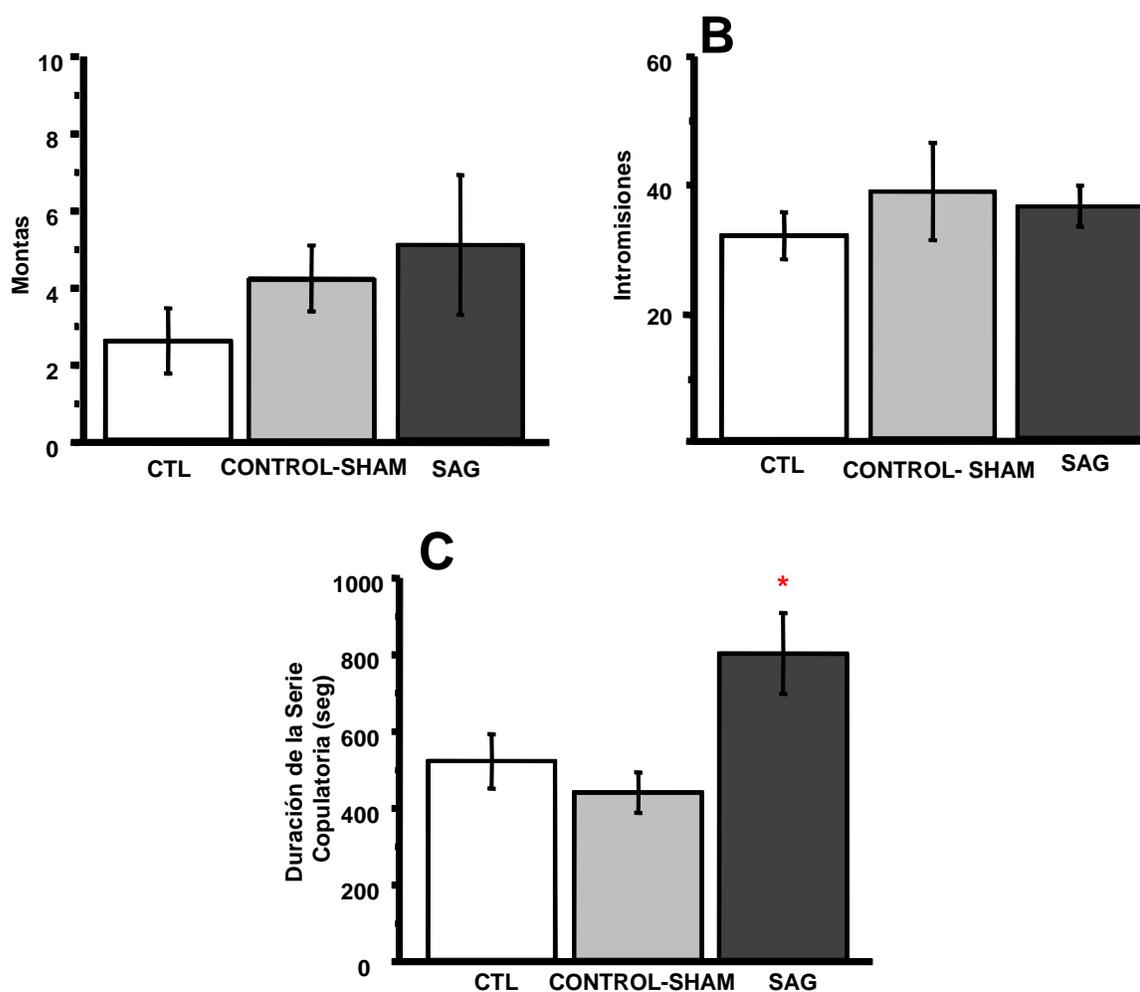


Figura 15. Prueba de Conducta Sexual de ratas macho. Se grafica en **A** el número de montas, en **B** el número de intromisiones y en **C** la duración de la serie copulatoria (seg). El SAG en su fase inicial induce incremento en la duración de la serie copulatoria. Grupos: **CONTROL**, ratas macho sexualmente expertas (barras blancas, $n=12$), **CONTROL-SHAM** ratas macho sexualmente expertas sin manipulación farmacológica (barras grises, $n=5$), **SAG** ratas macho sexualmente expertas con SAG (barras grises oscuro, $n=12$) y **SAG-GDX** ratas macho gonadectomizadas con SAG (barras negras, $n=8$). Media \pm E.E. ANOVA Post Hoc: Dunette ($p\leq 0.05$)

Lo anterior indica que los animales con SAG tuvieron una disminución significativa de la conducta sexual indicada por la acentuación de su duración pero no en su desempeño (Figura 15 A-C; barras grises oscuro A-C), además la motivación no se ve modificada por el SAG, ya que no se registraron diferencias estadísticamente significativas en la latencia a la primera intromisión (datos no mostrados).

Medición de la conducta depresiva durante el SAG

La última medición conductual de los animales con SAG fue la evaluación del perfil depresivo a través de la prueba de NF. Los animales fueron colocados en un cilindro con agua, en estas condiciones realizaron tres conductas distintas: trepar, nadar o finalmente quedarse inmóviles. La identificación de un estado semejante a la depresión en esta prueba conductual es que los animales disminuyen las conductas de trepado o nado (conductas activas), incrementando la inmovilidad (conducta pasiva).

Los animales del grupo control (Figura 16 A-C; barras blancas; n=12) ejecutaron la conducta de nado un promedio de 2 ± 0.4 eventos/5 min, en tanto que el número de ocasiones de la conducta de trepado fue de 6.6 ± 1.6 eventos/5 min. El número de veces que realizaron la conducta de inmovilidad fue de 51 ± 1.5 eventos/ 5 min.

El grupo control-SHAM (Figura 16 A-C; barras grises; n=5) no mostró diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en ninguna de las tres conductas previamente mencionadas (1.6 ± 0.6 nado; 11 ± 2.5 trepado; 47.4 ± 2.3 inmovilidad). En contraste, en el grupo de animales sexualmente expertos con SAG se cuantificaron diferencias estadísticamente significativas, en este grupo se incrementó la actividad de trepado (13.5 ± 1.9 eventos/5 min; $p \leq 0.05$) y se disminuyó de la conducta de inmovilidad (44.8 ± 1.6 eventos/5 min; Figura 16 A-C; barras grises oscuros; n=12, $p \leq 0.05$).

El grupo de animales GDX con SAG (Figura 16 A-C; barras negras; n=8) mostró un incremento significativo en la conducta de trepado (15.5 ± 1.7 eventos/5 min; $p \leq 0.01$) y una menor ejecución en la conducta de inmovilidad (43.1 ± 1.3 eventos/5 min; $p \leq 0.01$); es decir, que el SAG no induce un perfil depresivo.

La Conducta Tipo Depresiva Disminuye de durante el SAG

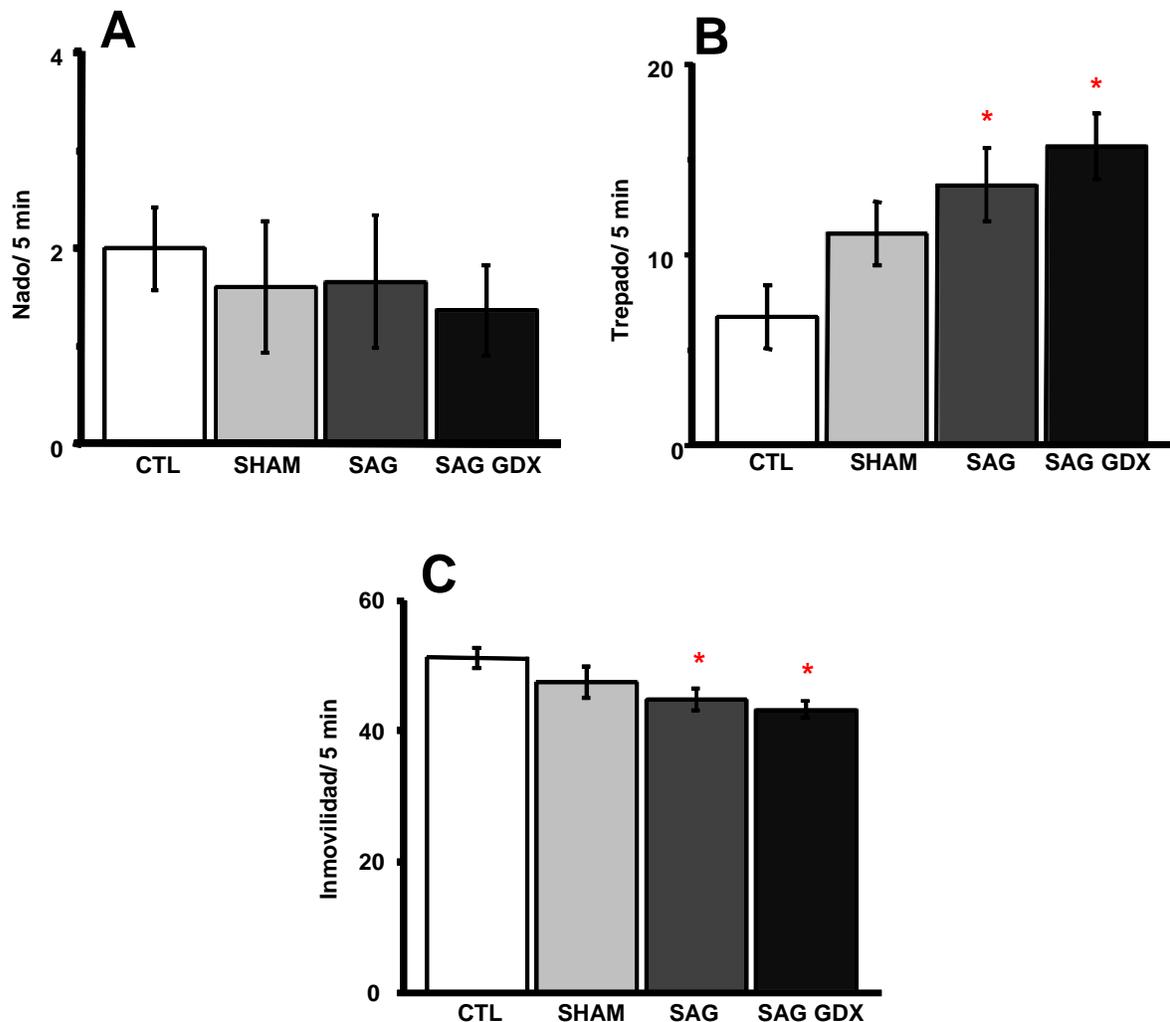


Figura 16. La prueba de Nado Forzado NF evalúa la conducta tipo depresiva. Menor realización de la conducta de trepado (conducta activa), aunado a mayor ejecución de inmovilidad (conducta pasiva) indican un perfil depresivo. Se muestra el número de conductas/ 5 min, en **A** el nado, en **B** el trepado y en **C** la inmovilidad. Nótese que el SAG induce incremento en el trepado y reducción en la inmovilidad. Grupos: **CONTROL**, ratas macho sexualmente expertas (barras blancas, n=12), **Control-SHAM** ratas macho sexualmente expertas sin manipulación farmacológica (barras grises, n=5), **SAG** ratas macho sexualmente expertas con SAG (barras grises oscuro, n=12) y **SAG-GDX** ratas macho gonadectomizadas con SAG (barras negras, n=8). Media \pm E.E. ANOVA Post Hoc: Dunette ($p \leq 0.05$)

VII. Discusión

Generalidades

Los resultados de la presente tesis mostraron cambios EEG y conductuales generados por la abstinencia aguda a GABA. Se identificó claramente que la actividad cortical en la región de infusión del neurotransmisor se incrementó y se caracterizó por la aparición de complejos espiga-onda de alta frecuencia y de gran amplitud que se redujo progresivamente después de la inducción de la abstinencia. La GDX tiene un efecto importante en los mecanismos de inducción del SAG, ya que la potencia de la actividad epileptiforme es mayor en estos animales. Cuantificamos que los animales en los primeros estadios de la abstinencia tienen una clara conducta de ansiedad. Con un perfil conductual que tiende a la disminución de la actividad sexual, asociado un incremento en la motilidad y reducción de la inmovilidad que indican que no hay presencia de un perfil depresivo en la rata macho.

Análisis espectral de Wavelets del SAG

No obstante que la aplicación del análisis del dominio de frecuencia por medio de la transformada de Fourier, obtiene una serie de números que representan a los componentes de la frecuencia, esta colección de datos tiene un inconveniente metodológico, las características estadísticas de la señal deben ser las mismas en cualquier punto; es decir, el análisis de Fourier es excelente para una señal estacionaria en términos de su distribución de amplitud en un momento determinado. El EEG de una crisis convulsiva o hiperexcitabilidad neuronal no cumple estrictamente con este criterio. Existen eventos transitorios como complejos espiga-onda, descargas de potenciales sinápticos poblacionales que no son estacionarias; es decir, no están sincronizadas como el que se tiene en la línea base o en condiciones control (Fernández- Mas et al., 1998). Esta es la razón por la cual en esta tesis se utilizó el análisis de frecuencia de Wavelets.

La teoría numérica que analiza eficientemente eventos estocásticos es el análisis de Wavelets y que puede describir espectralmente un fenómeno eléctrico, sin importar sus características estadísticas. Este método representa a la mejor herramienta matemática para el análisis espectral de eventos estacionarios y transitorios. Un incremento en la actividad (potencia) lo transforma en colores cálidos (rojo-naranja) y en contraparte su reducción se cuantifica con colores fríos (verde-azul).

Las señales aleatorias que se presentan en esta tesis son los complejos epileptiformes denominados espiga-onda, ocurren repentinamente en algún tramo del EEG y no son periódicas por lo que no pueden analizarse con el mismo análisis de distribución, el análisis de la señal eléctrica por el algoritmo de Wavelets representa una de las mejores estrategias matemáticas para cuantificar los cambios en forma aguda y crónica de la señal eléctrica del cerebro.

Neurobiología de los cambios del SAG

Datos previos de nuestra línea de investigación indican que el SAG inducido con la misma concentración (5 mM) y velocidad de instilación (3 μ l/h) durante 2 h, se obtiene una hiperexcitabilidad de la corteza cerebral instilada con una latencia promedio de 90 minutos y una duración de 7 días (Calixto et al., 1995). El análisis de resultados de la presente tesis muestra que la latencia de la primera espiga entre ratas macho sexualmente expertas y GDX no tiene diferencias (15.1 ± 1.4 min y 13.3 ± 1.2 min respectivamente), con duración de 9 días (Figuras 7 y 8). Estas diferencias estriban en algunos factores como el tamaño de la cánula de instilación (una cánula de mayor diámetro lesiona más), la profundidad de la instilación (instilación en capas profundas de la corteza cerebral generan una mayor hiperexcitabilidad); es decir, en la presente tesis la zona de lesión cerebral es mayor que en los trabajos previamente publicados.

La neurobiología de la inducción del SAG indica que se generan varios cambios en ambos componentes de la sinapsis. En la membrana presináptica

disminuye la síntesis y la liberación de GABA en los estadios tempranos de la hiperexcitabilidad neuronal y en consecuencia, la cantidad de GABA es dos veces menor que en condiciones basales (Salazar, 1994). En el componente postsináptico hay una disminución en el número de receptores GABA_A asociado a cambios en expresión de subunidades del receptor ionotrópico, como lo son los cambios en la expresión de la subunidad α que reducen significativamente la sensibilidad farmacológica del receptor (Brailowsky et al., 1988; Will et al., 1988, Casasola et al., 2002).

La fenomenología de la inducción del SAG indica claramente que primero son los cambios en la neurotransmisión GABAérgica y posteriormente se instalan modificaciones de otras neurotransmisiones (Brailowsky, 1991); es decir, la actividad epileptiforme (complejos espiga-onda) que se observa en el EEG después de la interrupción de la infusión de GABA depende de una modificación de la actividad sináptica que se inicia por la disminución del tono GABAérgico al cual se le agrega el incremento de la actividad de los receptores a glutamato (NMDA y AMPA), asociado al aumento del tono colinérgico y adrenérgico, sin modificaciones en la actividad serotoninérgica, cambios en la sensibilidad de algunos canales iónicos sensibles a voltaje como los canales de Ca²⁺ tipo L (Katsura et al, 2007). Si bien la ventana temporal de los sucesos sináptico-moleculares son difíciles de indicar nuestra línea de investigación muestra que las primeras 24 h el evento depende exclusivamente de los cambios de la neurotransmisión GABAérgica (Araneda et al., 1994).

Las neuronas de la corteza somatomotora instilada, foco de la descarga epiléptica, presentan un incremento en su actividad, una disminución de la actividad de los receptores muscarínicos, un incremento en la activación de receptores nicotínicos, una disminución de la corriente saliente de K⁺, un incremento de la expresión de la enzima acetilcolinesterasa, así como, un aumento del consumo de glucosa (Brailowsky, 1991). En contra parte, la corteza que solo es instilada con el vehículo del GABA (solución salina) no se

modifica a nivel EEG (Silva-Barrat et al., 2005; Silva-Barrat et al., 2001; Silva-Barrat y Champagnat, 1995; Araneda et al., 1994; Menini et al., 1991).

Relación potencia y número de eventos espiga-onda en el SAG

Una de las aportaciones de esta tesis fue la cuantificación selectiva del incremento en la actividad cortical en el cerebro de la rata al cual se le interrumpió la instilación GABA. Es observable mediante el análisis de Wavelets que la hiperexcitabilidad neuronal oscila entre 4-10Hz (Figura 7).

Esta es la primera vez que al SAG se le realizó un análisis de esta magnitud. Además, se analizó el hemisferio contralateral, a través de esta cuantificación se pudo identificar que durante el SAG el día de la inducción (*día 0*) se propaga la actividad epileptiforme en el EEG: **1)** con potencia y número de complejos espiga-onda semejantes a los presentes en la corteza somatomotora instilada (derecha; Figuras 8 y 9). No obstante que el hemisferio instalado tiene una gran actividad durante la evolución temporal de la abstinencia, el hemisferio contralateral tiene un patrón diferente, con gran actividad sólo día de inducción de la abstinencia y **2)** el aumento de la potencia del EEG tiene una relación proporcional con la presencia de el número de complejos espiga-onda durante el SAG, como lo propusieron Brailowsky et al. (1988) la actividad del SAG es una actividad epileptiforme de gran potencia en sus estadios iniciales.

Efecto de la gonadectomía en la hiperexcitabilidad neuronal del SAG

La inducción del SAG en el grupo GDX no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales sexualmente expertos en relación al cambio en el espectro de frecuencia, la actividad sobre la que aparece la hiperexcitabilidad se encuentra entre los 4-15 Hz (Figura 10). Sin embargo, al realizar el análisis cuantitativo de la potencia del EEG en este grupo de animales se muestra claramente que la GDX incrementa el voltaje de la

actividad eléctrica basal con respecto a los animales sexualmente expertos; esto se debe a que las hormonas sexuales son capaces de modificar el EEG tanto en machos como en hembras (Del Rio-Portilla et al., 1997; Juárez et al., 1995; Juárez y Corsi-Cabrera, 1995).

Durante la inducción y mantenimiento del SAG el incremento en la potencia del EEG en los animales GDX fue 40% mayor tanto en el hemisferio instilado como en el hemisferio contralateral comparado con el grupo de animales sexualmente expertos (Figuras 11 y 12). El análisis espectral muestra claramente que los neuroesteroides tienen influencia en la actividad EEG (Fernández-Guasti et al., 2003; Del Rio-Portilla et al., 1997; Juárez et al., 1995) de esta forma pueden modular la inducción y el mantenimiento de varias entidades farmacológicas y patológicas de la excitabilidad del SNC, en este caso el SAG es mucho mayor en animales GDX, lo cual indica claramente la importancia de las concentraciones hormonales de los animales, en especial la presencia de neuroesteroides y la susceptibilidad de generar hiperexcitabilidad neuronal.

En esta tesis se trabajó con animales sexualmente expertos, los cuales tienen mayor cantidad de T que los machos inexpertos sexualmente (Hull y Domínguez, 2007). Los resultados mostraron que los animales sexualmente expertos tienen una tendencia a mostrar menor potencia ($\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) en el EEG y en consecuencia diferencias en las manifestaciones electrofisiológicas del SAG.

El impacto de la extracción de las gónadas en las diferencias cuantificadas en el EEG en relación a los animales íntegros y GDX no modifica los mecanismos de inducción del SAG.

El análisis de la actividad epileptiforme el número de eventos espigonda es semejante entre animales sexualmente expertos y animales GDX durante el SAG (Figuras 12 y 13). Sin embargo, es de hacerse notar que el día 2 después de la inducción del SAG existe una reducción significativa en el

número de eventos epileptiformes en los animales que tuvieron conducta sexual, se sugiere que este evento se asocia con la liberación de T (Edinger y Frye, 2007), en este contexto podría relacionarse la modulación alostérica positiva que tiene la T en el receptor GABA_A la cual aumenta la corriente de Cl⁻ y disminuye la corriente de Ca²⁺ (Martín-García et al., 2007; Schumacher et al., 2003).

Esta liberación de T inducida por la conducta sexual (montas, intromisiones y eyaculación), se refleja un día después del inicio del SAG a nivel EEG, los eventos espiga-onda se reducen significativamente en los animales sexualmente expertos (Figura 13; los animales GDX no tuvieron actividad sexual y por ende no mostraron este perfil).

La T es metabolizada como un esteroide neuroactivo por dos vías: la primera es convertirla en androstanediona, para después ser reducida a androsterona; la segunda es convertirla en 5 α -dihidrotrestosterona (DHT) para ser metabolizada en androstandiol; el efecto genómico de la T en el cerebro es a través de los receptores a andrógenos, a diferencia de sus metabolitos reducidos, lo cuales potencian la actividad de los receptores GABA_A (actividad no genómica) en analogía a la acción de los metabolitos reducidos de la P₄ (Samba y Jian, 2010; Foradori et al., 2008; King, 2008 Martín-García et al., 2007; Scharman y MacLusky., 2006; Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2005; Reddy, 2004).

La DHT es categorizada como un neuroesteroide. Sugerimos que la ausencia de andrógenos en los animales GDX aumenta significativamente la potencia basal del EEG; estos animales presentan un incremento significativo en el voltaje de la actividad electrofisiológica 21 días después de haberles extirpado los testículos. Aunado a esto, dado que los animales eran sexualmente expertos sugiere altos niveles en el espacio sináptico de T y por tanto de DHT. En este contexto, algunas investigaciones han propuesto que las hormonas sexuales pueden tener un efecto anticonvulsivo modulando la

actividad GABAérgica en la epilepsia, demostrando así que pueden expresar un efecto favorecedor y por tanto disminuir las crisis, además se ha encontrado que pueden tener un efecto protector en neuronas del hipocampo lesionadas con ácido kaínico o por pentilinetatrazol (Reddy, 2004; Ramsden, et al., 2003; Frye y Reed, 1998; Frye, 1995; Kubli-Garfias et al., 1982); sin embargo, si los niveles de T sobrepasan los niveles fisiológicos (concentraciones nM), pueden dañar a las neuronas, produciendo apoptosis (Estrada et al., 2006).

Evidencias clínicas han demostrado que la epilepsia en los hombres puede tener repercusiones en que impacten en los niveles hormonales y por tanto su actividad sexual, esto depende de la severidad de las crisis y de los fármacos que se utilicen para tratarla (Verrotti et al., 2011; Montouris y Morris, 2005). En esta tesis se ha demostrado que la instilación de GABA y su retiro abrupto inducen el aumento en la excitabilidad neuronal, esta condición se exagera cuando no hay T y por lo tanto sus metabolitos reducidos.

En conjunto los datos anteriores muestran la importancia que tiene la T y sus metabolitos α -reducidos en la regulación del sistema GABAérgico y la modulación de la actividad eléctrica del cerebro (Reddy, 2004).

Incremento de la ansiedad en el SAG

El cambio de la activación del sistema nervioso autónomo permite el incremento del metabolismo, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria disminución en la atención, asociado a un incremento de la sensibilidad sensorio-perceptiva conocido en el campo clínico como ansiedad. Las estructuras anatómicas relacionadas con la generación y expresión de la conducta ansiosa son: la amígdala cerebral, el hipocampo y la Cx prefrontal (Möhler, 2012; Clement y Chapouthier, 1997).

La conducta de ansiedad aparece como un fenómeno de adaptación ante un estímulo amenazante, pero también puede ser el resultado de cambios en la plasticidad neuronal durante los primeros estadios de síndromes de

abstinencia a diferentes drogas. El estudio de la ansiedad actualmente en el campo de las neurociencias puede estimarse por el incremento de la actividad cortical en mamíferos; es decir, aparece en el EEG una actividad de disminución en potencia asociada a un incremento en la frecuencia de la actividad basal.

Clínicamente sabemos que la ansiedad es la manifestación de la conducta del miedo la cual se caracteriza por un estado de alerta continua ante el peligro (Möhler, 2012). Este es un proceso común en la vida adulta del ser humano. La ansiedad es uno de los componentes de muchos síndromes y psicopatologías relacionados a cambios en la neurotransmisión GABAérgica, glutamatérgica, serotoninérgica y noradrenérgica (Martín-García et al., 2007; Czlonskowska et al., 2003; Clement y Chapouthier, 1997).

El LEC es un instrumento cuantitativo en el cual se puede medir objetivamente la manifestación de la ansiedad de roedores, esta herramienta experimental es confiable y reproducible (Rodgers et al., 1997; Pellow et al., 1985). La cuantificación del efecto ansiolítico de los fármacos a través de este instrumento se ha validado en el campo de las neurociencias, los fármacos que tienen estas propiedades son agonistas o moduladores alostéricos positivos del receptor GABA_A como las Bz; en esta tesis planteamos que la disminución del tono GABAérgico que genera el SAG tiene como consecuencia la aparición de ansiedad en los primeros estadios.

En la Figura 14 de esta tesis, se muestran el análisis de los resultados de la medición de la ansiedad en los grupos de animales con SAG, tanto íntegros como GDX. Debemos tomar en cuenta que los animales (sin GDX), tienen experiencia sexual (15-20 días), esta condición es capaz de incrementar los niveles plasmáticos y cerebrales de T (Edinger y Frye, 2007; Hull y Domínguez, 2007), lo cual puede influir en la disminución de la conducta de ansiedad, sin embargo, el SAG, como era de esperarse genera un perfil ansiogénico en los animales, de esta forma aceptamos la hipótesis 2, este

efecto no es modificado por la ausencia de hormonas testiculares por lo tanto rechazamos la hipótesis 4.

Aunado a esto, datos recientes en nuestro laboratorio, confirman que la aparición de complejos espiga-onda en el EEG (hiperexcitabilidad cortical por abstinencia a Dz) se acompañan de un perfil ansioso (Cornejo, 2011); es decir, la disminución de la actividad GABAérgica es capaz de manifestar conductas ansiosas (Picazo et al., 2006; Fernández-Guasti y Picazo, 1999).

La GDX disminuye la concentración de los niveles de T, estudios previos han demostrado que este estado induce por sí sólo la aparición de ansiedad. En este contexto, la aplicación de análogos de T (propionato de testosterona), disminuye la manifestación de la conducta ansiosa; este efecto puede estar mediado por la acción de los sus metabolitos reducidos (Justel et al., 2010; Edinger y Frye, 2007; Fernández-Guasti y Martínez-Mota, 2003; Frye y Edinger, 2004; Frye y Seliga, 2001; Bitran et al., 1993).

Datos previos a esta tesis muestran que en hembras la OVX reduce los niveles de P_4 y E_2 de una manera semejante son capaces de producir ansiedad (Cornejo, 2011; Frye y Edinger, 2004; Picazo et al., 2006).

El SAG induce disminución de la Conducta Sexual de la rata macho

Se sabe que la conducta sexual de los machos se debe a la secreción de T en las células de Leydig ubicadas en los testículos; ésta es metabolizada en las células diana ya sea en E_2 (por aromatización) o dihidrotestosterona (por 5α -reducción). El tracto mesocorticolímbico asciende del VTA hacia el NAc y la Cx prefrontal, este recibe aferencias del POA; para este evento la T tiene una gran actividad genómica en la liberación de DA en estas estructuras (Pfaus et al., 2010; Hull y Domínguez, 2007).

Diversos trabajos experimentales previos a esta tesis muestran que los esteroides sexuales inducen o modifican la respuesta sexual en los roedores,

modulando la actividad de diversas regiones del cerebro para la expresión de la conducta sexual. Las estructuras mesolímbicas (VTA, NAc, POA y Cx prefrontal) son las responsables del inicio y el mantenimiento de la conducta sexual (Crews, 2010; Hull y Domínguez, 2007; Hull et al., 2006). En este contexto las interacciones sinápticas de la actividad a GABAérgica son de suma importancia en la conexión de circuitos de interconexión en las áreas límbicas lo cual ayuda a reforzar o inhibir los procesos de reforzamiento de conductas como en el caso de las adicciones, los procesos hedónicos o las conductas relacionadas a la reproducción (Fernández-Guasti et al., 1985). Es decir que la actividad de los esteroides sexuales es fundamental para la aparición de estrategias neuronales relacionadas con el proceso sexual (King, 2008).

La T en los machos es responsable de una diversidad de actividades fisiológicas y en su caso, patológicas en el SNC. Por ejemplo, modulan indirectamente los procesos de atención, memoria, motilidad, ubicación espacial y sueño (Justel et al., 2010; Zheng, 2009; Martín-García et al., 2007; Montouris y Morris, 2005). Pero también se ha relacionado con la aparición de algunos tumores. Este andrógeno es capaz de modular la liberación de algunos neurotransmisores en el sistema límbico, específicamente la DA, la oxitocina, la vasopresina, el GABA y el glutamato (Foradori et al., 2008).

En resumen, la actividad de la T sobre la modulación de la conducta sexual es a tres niveles: 1) modificando la liberación de diversos neurotransmisores, 2) a través de interacción con sus receptores intracelulares (latencia duraciones largas) y 3) modulando la excitabilidad neuronal mediante su acción en los receptores (duración corta; Foradori et al., 2008).

En términos generales, un mayor el número de montas o intromisiones es reconocido como un incremento en la conducta sexual del macho, pero el aumento del tiempo invertido en una serie copulatoria tiene una connotación de inhibición. Los datos de la Figura 15 muestran claramente que los animales con

abstinencia tienen un incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo control en la duración de la serie copulatoria. No obstante que el número de montas e intromisiones no se modificaron. Datos previos de nuestra investigación muestran que estos datos son semejantes en el síndrome de abstinencia a Dz (Cornejo, 2011).

La abstinencia a GABA en su etapa inicial induce claramente un cambio en los mecanismos de la sinapsis, disminución en el número de receptores activos en la síntesis y en su liberación (Casasola et al., 2000). Con respecto a los cambios evidenciados en la conducta sexual queda de manifiesto que la sensibilidad GABA se ve modificada en estos animales. Al disminuir el número de receptores, la reducción de GABA en el espacio sináptico modifica la liberación de DA y NE en estructuras límbicas y en consecuencia este proceso puede modificar negativamente la actividad sexual.

El aumento de la actividad GABAérgica en el POA de las ratas macho bloquea la actividad sexual (Fernández-Guasti et al., 1986), y la aplicación de antagonistas del receptor GABA_A en estructuras límbicas aumenta su comportamiento sexual. El POA produce neuroesteroides considerados necesarios para la motivación sexual, la erección, la copulación y la eyaculación (King, 2008).

Estos antecedentes comparados con los resultados de esta tesis indican que la modificación de la actividad GABAérgica está directamente relacionada con la conducta sexual de los roedores machos; es decir, el SAG tiene un efecto inhibitorio de la conducta sexual aumentando la duración de la serie copulatoria sin modificar las intromisiones ni las montas, a diferencia de lo que se presenta durante la abstinencia a Dz en ratas hembra (Cornejo, 2011), lo que lo hace funcional y anatómicamente distinto entre sexos.

Los neurotransmisores que promueven la conducta sexual de la rata macho son la NE y Ach mientras que el GABA y el 5-HT pueden ser inhibitorias (Justel et al., 2009; Fernández-Guasti y López-Ruvalcava, 1997). Pero además,

la concentración plasmática de T, la actividad testicular y la madurez del SNC están involucradas tanto en la conducta del inicio, como de búsqueda y de ejecución mediante los derivados reducidos en la T como la de DHT. La concentración extracelular de GABA después de la eyaculación, lo que sugiere su efecto inhibitorio (Hull y Domínguez, 2007).

El hipotálamo es una región importante para la CS y el hipocampo es una estructura importante para la conducta de ansiedad, la experiencia sexual induce un incremento de los niveles de andrógenos (T y DHT) en ambas estructuras, este evento reduce la conducta de ansiedad (Edinger y Frye, 2007). Sin embargo, el SAG genera un estado de ansiedad que puede alterar los niveles hormonales, incluidos los corticosteroides, los cuales influyen en las conductas afectivas.

La experiencia sexual, además de generar un cambio en los niveles plasmáticos y en ciertas estructuras cerebrales, también puede generar cambios permanentes en el cerebro o su estructura neuronal y función en las ratas macho, sin tomar en consideración la secreción de andrógenos (Hull y Domínguez, 2007; Dabbs y Mohammed, 1992).

Como se mencionó anteriormente estudios clínicos han demostrado que la epilepsia puede tener efectos negativos en la conducta sexual, alterando la regulación hipotalámica del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG) o por la acción de los antiepilépticos (Verrotti et al., 2011; Montouris y Morris, 2005). En hombres con epilepsia se han encontrado niveles altos de prolactina, disminución de niveles de hormona leuteinizante y T libre, lo que tiene como consecuencia disminución en el deseo (Verrotti et al., 2011; Montouris y Morris, 2005). El SAG induce hiperexcitabilidad neuronal, este es un tipo de epilepsia parcial ya que solo se manifiesta en la zona de instilación (Brailowsky et al., 1989; 1987; 1988; Will et al., 1988; Fukuda et al., 1987, Montiel et al., 2000).

Es importante recalcar que con los datos de esta tesis se rechaza lo planteado en la primera hipótesis, se obtuvo aumento de la serie copulatoria sin

modificar la motivación o la ejecución de la conducta, esto puede estar a que las estructuras que regulan la liberación de corticosteroides, en condiciones de ansiedad, y a la liberación de HL son las mismas (hipotálamo e hipofisis) con distintos órganos blanco (glándulas adrenales y testículos respectivamente), se ha demostrado que no se pueden activar al mismo tiempo. Otra posibilidad es que el SAG al modificar la actividad de áreas límbicas fundamentales en la conducta sexual la module negativamente.

Efecto del SAG en la conducta tipo-depresiva

Se ha reportado previamente que una disminución en los niveles circundantes de T pueden asociarse con cambios psicológicos en el hombre, generando estados de violencia, irritabilidad, disminución de la libido y disfunción sexual. La exposición constante a estímulos estresantes es la principal causa de esta patología generando cambios plásticos en el cerebro, asociado a la alteración del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal (HHA).

En el campo de las neurociencias se ha identificado una correlación negativa entre los niveles de T y el incremento de patologías como la ansiedad y la depresión. Un ejemplo de esta relación es al cuantificar en la ingesta de anabólicos esteroides y la mejoría en la depresión, además se ha sugerido que los andrógenos facilitan el efecto de fármacos antidepresivos tricíclicos (Kokras et al., 2012; Duval et al., 2010; Justel et al., 2010; Toth et al., 2008; Martínez-Mota y Fernández-Guasti., 2004).

Los estímulos estresantes o amenazantes activan el eje HHA como una medida de adaptación, su respuesta está sujeta a la intensidad y duración del estímulo, cuando el sistema regulador funciona adecuadamente la respuesta fisiológica ante el estrés se estabiliza y tiene duración máxima de 20 min a causa de la acción de los glucocorticoides al restablecer la homeostasis del organismos después del evento estresante. Si los niveles de cortisol no disminuyen (hipersecreción de cortisol) a causa de exposiciones prolongadas a estímulos estresantes se manifiesta un estado de depresión severa (Duval et al., 2010; Korte, 2001).

Un modelo animal altamente utilizado y reproducible que nos permite evaluar un estado tipo depresivo es la prueba de NF, mediante ella se ha evaluado el efecto de fármacos antidepresivos, en este paradigma se examinan tres conductas básicas, las primeras dos son consideradas activas (nado y trepado) y la tercera es pasiva (inmovilidad). Mediante el uso de esta prueba se puede identificar la presencia de un perfil tipo-depresivo; cuando los animales tienen un incremento en la conducta de inmovilidad y una reducción de las conductas de nado o trepado (Porsolt et al., 1998; Dekte y Lucki, 1996; Nishimura et al., 1987).

En la prueba de NF las ratas macho presentan más ocasiones la conducta de inmovilidad que las ratas hembra en condiciones control; también responden diferencialmente a los antidepresivos, en los machos los antidepresivos tricíclicos tienen un mejor efecto; en cambio las hembras mejoran con la administración de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina. Los niveles de corticosterona y glucocorticoides modulan esta respuesta y son necesarios para la expresión de la conducta de inmovilidad. Las diferencias sexuales en la acción de los antidepresivos se han atribuido a la participación diferencial de las hormonas sexuales. En las hembras, las hormonas esteroides (E_2 y P_4) tienen potentes efectos antidepresivos; en los machos, los andrógenos producen similares acciones antidepresivas evaluadas en la prueba de NF (Kokras, 2012; Frye, 2011; Martínez-Mota et al., 2011; 2008; Martínez-Mota y Fernández-Guasti, 2004; Dekte y Lucki, 1996).

Los resultados de la presente tesis muestran que ambos grupos de animales con SAG sexualmente expertos y GDX, tienen un incremento en la ejecución de la conducta de trepado asociado a una disminución en la realización de la inmovilidad, sin modificaciones en la conducta de nado (Figura 16). Es decir, que la ausencia de T no modifica el perfil que se manifiesta durante el SAG. Sin embargo, el resultado obtenido en esta tesis, es distinto a lo que se ha encontrado en los antecedentes clínicos que señalan que la deficiencia en los niveles de corticales GABA (Bartholini, 1987), la disminución

de los receptores GABA_A en la corteza (Petty et al., 1994) y la evidencia de que estos pacientes tienen menor número de neuronas GABAérgicas en la corteza cerebral (Möhler, 2012) son características encontradas en pacientes con desorden depresivo mayor.

Atribuimos esta diferencia con lo encontrado clínicamente y a lo propuesto en la hipótesis 3, a que la abstinencia a GABA solo genera una disminución parcial de su concentración (en el área instilada y núcleos subcorticales), y que parte de sus mecanismos son activar otras neurotransmisiones, teniendo una amplia modificación de los procesos neuronales noradrenérgicos y colinérgicos, sin modificaciones en los sistemas serotoninérgicos y peptídicos. En este sentido recordemos que la actividad colinérgica está involucrada en la conducta de trepado en el NF (Araneda et al., 1994).

Aunado a esto se ha encontrado que la subunidad $\alpha 2$ del receptor GABA_A participa en el efecto antidepresivo de algunos fármacos, sugiriendo que esta subunidad puede estar participando de manera positiva durante el SAG, ambos mecanismos pueden generar cambios plásticos que permiten a los animales traten de escapar de esa situación aversiva con más impulso que los animales control. La presencia de glucocorticoides es necesaria para la expresión de la respuesta de inmovilidad, en este sentido el SAG puede tener un efecto en la liberación de glucocorticoides lo que produce menor presencia de esta conducta. Otro aspecto interesante es que ni la motivación ni la ejecución de la conducta sexual fueron modificadas, este resultado concuerda con la ausencia de un estado depresivo en nuestros animales con SAG (Vollenweider et al., 2011; King, 2008; Toth et al., 2008; Korte, 2001; Salazar et al. 1994; Brailowsky, 1991; Brailowsky et al.1990; 1988; Menini et al., 1991).

VII. Conclusiones

1. Existe un incremento de la actividad del EEG inducida por el SAG.
2. El SAG es más severo en las ratas macho GDX.
3. Durante el SAG en animales íntegros y GDX, la hiperexcitabilidad neuronal permite la aparición de ansiedad.
4. El SAG disminuye la conducta sexual de la rata macho.
5. El SAG en animales íntegros y GDX no induce un perfil depresivo.

VIII. Referencias

- Abramson, L. Y. y Seligman, E. P. (1978). Learned Helplessness in Humans: Critique and Reformulation. *Journal of Abnormal Psychology*, 37: 49-74.
- Academia Nacional de Medicina. (1999). Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. *National Research Council*. 1-84.
- Agmo, A.; Contreras, J.L. y Paredes, R. (1991). Sexual Behavior and Copulatory Thrusting Patterns in male rabbits after treatment with GABA transaminase inhibitors. *Physiology and Behavior*, 49: 73-78.
- Araneda S, Silva-Barrat C, Menini C, Naquet R. (1994). High Expression of Noradrenaline, Choline Acetyltransferase and Glial Fibrillary Acid Protein in the Epileptic Focus Consecutive to GABA Withdrawal. An Immunocytochemical Study. *Brain Research*. 655(1-2): 135-146.
- Avoli, M., Hwa G., Louvel, I., Kurcewicz, R., Pumain, R. & Lacaille, J. C. (1997). Functional and Pharmacological Properties of GABA-mediated Inhibition in the Human Neocortex. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75: 526-534.
- Barholini, K., Lloyd, G. y Morselli, P. L. (1987). GABA and Mood Disorders. Experimental and Clinical Research. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 11: 247-252.
- Bazemore, A., Elliott, K. & Florey, E. (1956). Factor I and γ -Aminobutyric Acid. *Nature*, 178:1052-1053.

- Bitran, D., Kellogg, C.K., Hilvers R.J. (1993). Treatment with an Anabolic-Androgenic Steroid Affects Anxiety-Related Behavior and Alters the Sensitivity of Cortical GABA_A Receptors in the Rat. *Hormone Behavior*, 27: 568-583.
- Bonnet, U. y Bingmann, D. (1995). GABA_A Responses of CA3 Neurons: Contribution of Bicarbonate and of Cl⁽⁻⁾-Extrusion Mechanisms. *Neuroreport*, 6: 700-704.
- Bormann, J. (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B Receptors Subtypes. *TINS*, 11(3).
- Bowery, N. (1990). GABA Transporter Protein Cloned from de Rat Brain. *TIPS*, 11: 435- 437.
- Brailowsky, S, Silva-Barrat. C., Menini, C., Riche, D. y Naquet, R. (1989). Effects of Localized, Chronic GABA Infusions into Different Cortical areas of the Photosensitiva Baboon, Papio Papio. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 72: 147-156.
- Brailowsky, S. (1991). The GABA-Withdrawal Syndrome. *Proceedings of the Western Pharmacology Society's* 34: 227-228
- Brailowsky, S. (1999). *Epilepsia Enfermedad Sagrada del Cerebro*. México: Fondo de Cultura Económica.
- Brailowsky, S. (2000). *Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología*. México: Fondo de Cultura Económica.

- Brailowsky, S. y García, O. (1999). Ethanol, GABA and Epilepsy. *Archives of Medical Research*. 30, 3-9.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Silva-Barrat, C., Menini, C. y Naquet, R. (1990). Electroencephalographic Study of the GABA-withdrawal Syndrome in Rats. *Epilepsy*, 31: 369-377.
- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C. y Naquet, R. (1987). Epileptogenic Gamma-Aminobutyric Acid Withdrawal Syndrome after Chronic Intracortical Infusion in Baboons. *Neuroscience Letters*, 74: 75-80.
- Brailowsky, S., Montiel, T., Hernández, E., Marescaux, C., Vergnes, M. (1992). Effects of 3-hydroxy,3-ethyl,3-phenylpropionamide (HEPP) on Rat Models of Generalized and Focal Epilepsy. *Epilepsy Research*, 11: 167-172
- Brailowsky, S.; Masayuki, K.; Menini, C., Silva- Barrat. C., Riche, D. y Naquet, R. (1988). The GABA- Withdrawal syndrome: a New Model of Focal Epileptogenesis. *Brain Research*. 442: 175-179
- Calderón de la Barca Gázquez, J.M., Berlango, A., Calvo, R. y Jiménez, L. (2005). Estado Epiléptico. *Emergencias*, 17: S74-S78.
- Calixto, E. (2001). *Incremento en la Excitabilidad de La Corteza Cerebral Por Efecto de la Privación de GABA o Benzodiazepinas. Efecto Coadyuvante de los Neuroesteroides*. Tesis de Doctorado, UNAM, Ciudad de México, México.

- Calixto, E. (2012). La Abstinencia al GABA: 20 años de un Modelo de Hiperexcitabilidad Neuronal. *Salud Mental*, 35: 427-434.
- Calixto, E., López- Colomé, C., Casasola, C., Montiel, T., Bargas, J. y Brailowsky, S. (2000). Neocortical Hyperexcitability after GABA Withdrawal in Vitro. *Epilepsy Research*, 39: 13-26.
- Calixto, E., Montiel, T., Lemini, C. Brailowsky, S. (1995). Allopregnanolone Potentiates a GABA-withdrawal Syndrome in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience Letters*, 195: 73-76.
- Carlson, N. (2006). Fisiología de la Conducta. México: Pearson, 120-140.
- Casasola, C., Bargas, J., Arias-Montaño, J.-A., Calixto, E., Montiel, T., Galarraga, E. y Brailowsky, S. (2002). Hippocampal Hyperexcitability Induced by GABA Withdrawal Syndrome is due to Down- Regulation of GABA Receptors. *Epilepsy Research*, 47: 257- 271.
- Chebib, M., Johnston, G. (1999). The ABC of GABA Receptors: a Brief Review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 26: 937-940.
- Clement, Y. y Chapouthier, G. (1997). Biological Bases of Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 623-633.
- Cornejo, J. M. (2011). *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*. Tesis de licenciatura, Universidad

Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.

Cortés-Romero, C., Galindo, F., Galicia- Isasmendi, S. y Flores A. (2011).

GABA: ¿Dualidad Funcional? Transición durante el Desarrollo. *Revista de Neurología*. 52: 665- 675.

Costa, E. (1987). Polytypic Signaling at GABAergic Synapses. *Life sciences*.

42: 1407-1417.

Covarrubias, M. & Tapia R. (1980). Brain Glutamate Descarboxylase:

Properties of its Calcium-Dependent Binding to Liposomes and Kinetics of the Bound and the Free Enzyme. *Journal of Neurochemistry*, 34: 1682-1688.

Crews, D. (2010). Neural Control of Sexual Behavior. University of Texas. USA.

Croakin, P. Levinson, A. y Daskalakis, Z. (2011). Evidence for GABAergic

Inhibitory Deficits in Major Depressive Disorder. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 35:818-825.

Czlonkowska, A. I., Zienowicz, M., Bidzinski, A., Maciejak, P., Lehner, M.,

Taracha, E. Wislowska, A. y Plaznik, A. (2003). The Role of Neurosteroids in the Anxiolytic, Antidepressive- and Anticonvulsive effects of Selective Reuptake Inhibitors. *Medical Science Monitor*, 9: RA270-275.

- Dabbs, J. M. Jr. y Mohammed, S. (1992). Male and Female Salivary Testosterone Concentrations Before and After Sexual Activity. *Physiology and Behavior*, 52: 195-197.
- Del Río-Portilla, I., Ugalde, E., Juárez, J., Roldán, A. y Corsi-Cabrera, M. (1997). Sex Differences in EEG in Adult Gonadectomized Rats before and after Hormonal Treatment. *Psychoneuroendocrinology*, 22: 627-642.
- Detke, M. y Lucky, I. (1996). Detection of Serotonergic and Noradrenergic Antidepressants in the Rat Forced Swimming Test: the Effects of Water Depth. *Behavioural Brain Research*. 73: 43-46.
- Deutch, A. y Roth, R. (1999). *Neurotransmitters*. En M, Zigmond, F. Bloom, S. Landis, J. Roberts & L. Squire. (Eds.), *Fundamental Neuroscience* (49-60). California.
- Domjan, M. (2003). *Principios de Aprendizaje y Conducta*. Wadsworth Cengage Learning.
- Duval, F., González, F. y Rabia, H. (2010). Neurobiología del Estrés. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, 48: 307-318.
- Edinger, K.E. y Frye, C.A. (2007). Sexual Experience of Male Rats Influences Anxiety-Like Behavior and Androgen Levels. *Physiology and Behavior*, 92: 443-453.

- Estrada, M., Varshney, A. y Ehrlich, B. (2006). Elevated Testosterone Induces Apoptosis in Neuronal Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 25492-25501.
- Feldman, A., Meyer, C., Quesner, C. (1996). Principles of *Neuropsychopharmacology*. Academic Press.
- Fernández-Guasti, A. y López-Rubalcava, C. (1997). Modification of the Anxiolytic Action of 5-HT_{1A} Compounds by GABA-Benzodiazepine Agents in Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60: 27-32.
- Fernández-Guasti, A. y Martínez-Mota, L. (2003). Orchidectomy Sensitizes Males Rats to the Action of Diazepam on Burying Behavior Latency: Role of Testosterone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75; 473-479.
- Fernández-Guasti, A. y Picazo, O. (1999). Sexual Differentiation Modifies the Allopregnanolone Anxiolytic Actions in Rats. *Psychoneuroendocrinology*, 24: 251-267.
- Fernández-Guasti, A. y Rodríguez-Manzo, G. (1994). "Bases Biológicas de la Conducta Sexual en Animales". En E. Rubio. *Antología de la Sexualidad Humana*. México: Consejo Nacional de Población, 455-474.
- Fernández-Guasti, A., Del Río Portilla, I. Y., Ugalde, E., Corsi-Cabrera, M. (2003). Diazepam and Progesterone Produce Sexually Dimorphic

- Actions on the Rat EEG: Role of the Neonatal Sexual Differentiation Process. *Psychoneuroendocrinology*, 28: 85-100.
- Fernández-Guasti, A., Larsson, K. y Beyer, C. (1985). GABAergic Control of Masculine Sexual Behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24: 1065-1070.
- Fernández-Mas, R., Valdés, A., Martínez, A., Magdaleno, V., Almazán S., Martínez, D. y Fernández- Guardiola, A. (1998). Visualización Gráfica de las Transiciones del Sueño en el Hombre: Métodos de Representación Tridimensional. *Salud Mental*, 6: 27- 32.
- Filip, M. y Frankowska, M. (2008). GABA_B Receptors in Drug Addiction. *Pharmacological Reports*: 80, 755-770.
- Flanagan-Cato, L.M. (2011). Sex Differences in the Neural Circuit that Mediates Female Sexual Receptivity. *Frontiers in Neurobiology*: 124- 136.
- Foradori, C. D., Weiser, J. y Handa, R. J. (2008). Non-Genomic Actions of Androgens. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29: 169-181.
- Foster, A. y Kemp, J. (2006). Glutamate- and GABA- based CNS Therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6: 7-17.
- Frankowka, M., Filio, M. y Przegalinski, E. (2007). Effects of GABA_B Receptor Ligands in Animal Test of Depression and Anxiety. *Pharmacological Response*, 59: 645.655.

- Frye, C. A. (1995). The Neurosteroid 3 α ,5 α -HTP has Antiseizure and Possible Neuroprotective Effects in Animal Model of Epilepsy. *Brain Research*, 696: 113-120.
- Frye, C. A. (2001). The Role of Neurosteroids and Non genomic Effects of Progestins in the Ventral Tegmental Area in Mediating Sexual Receptivity in Rodents. *Hormones and Behavior*; 40: 226- 233.
- Frye, C. A. (2011). Progesterone Attenuates Depressive Behavior of Younger and Older Adult C57/BL6, Wildtype and Progesterone Knockout Mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 99: 525-531.
- Frye, C. A. y Edinger, K. L. (2004). Testosterone's Metabolism in the Hippocampus may Mediate its anti-anxiety Effects in Male Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78: 473-481.
- Frye, C. A. y Reed, T. A. W. (1998). Androgenic Neurosteroids: Anti-Seizure Effects in an Animal Model of Epilepsy. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 385-399.
- Frye, C. A. y Seliga, A. M. (2001). Testosterone Increases Analgesia, Anxiolysis, and Cognitive Performance of Male Rats. *Cognitive, Affective & Behavioral Neuroscience*, 1: 371-381.
- Frye, C. A., Rhodes, M. E., Petralla, S. M., Walf, A. A., Sumida, K. y Edinger, L. (2006). 3 α -Hydroxy-5 α -pregna-20-one in the Midbrain Ventral Tegmental

- Area Mediates Social, Sexual and Affective Behaviors. *Neuroscience*, 138: 1007-1014.
- Frye, C.A. y Paris, J.J. (2009). Infusions of Bicuculline to the Ventral Tegmental Area Attenuates Sexual, Exploratory, and Anti-anxiety Behavior of Proestrous Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 93: 474-481.
- Fukuda, H., Brailowsky, S., Menini, C., Silva- Barrat. C., Riche, D. y Naquet, R. (1987). Anticonvulsant Effect of Intracortical, Chronic Infusion of GABA in Kindled Rats: Focal Seizures upon Withdrawal. *Experimental Neurology*, 98: 120-129.
- García-Ugalde, G., Gallarraga, E., Bargas, J. y Brailowsky, S. (1992). Hyperexcitability of Hippocampal CA1 Region in Brain Slices after GABA Withdrawal. *Neuroscience Letters*. 147(2):229-32.
- González, R. y Hernández, M. (2002). Aspectos Motivacionales de la Conducta Sexual. En M. Hernández, *Motivación Animal y Humana*. 127- 151.
- Graña, J. y Carrobles, J. A. (1991). Condicionamiento Clásico en la Adicción. *Psicothema*, 3: 87-96.
- Grover, L. M., Lambert, N., Schwartzkroin, P., & Teyler, T. (1993). Role of HCO₃⁻ in Depolarizing GABA_A Receptor-mediated Responses in Pyramidal Cells of Rat Hippocampus. *Neurophysiology*, 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.
- Hagge, D., Bäckström, T. y Johansson, S. (2005). Interaction between Allopregnanolone and Pregnanolone Sulfate in Modulating GABA-mediated Synaptic Currents in Neurons from the Rat Medial Preoptic Nucleus. *Brain Research*, 1033: 58-67.
- Herrera, E. (1986). *Bioquímica*. México: Interamericana, 1160-1162.
- Herrera-Pérez, J. J., Martínez-Mota, L., Chavira, R. y Fernández-Guasti, A. (2012). Testosterone Prevents but not Reverses Anhedonia in Middle-aged Males and Lacks an Effect on Stress Vulnerability in Young Adults. *Hormones and Behavior*, Article in Press.
- Houser, C., Vaughn, J., Hendry, S., Jones, E., & Peters. A. (1984). GABA Neurons in the Cerebral Cortex. En: E.G. Jones & A. Peters (Eds.), *Functional Properties of Cortical Cells*. (pp. 63-89), New York: Plenum Press.
- Hull, E. M. y Domínguez, J. M. (2007). Sexual Behavior in Male Rodents. *Hormones and Behavior*, 52: 45-55.
- Hull, E. M., Lorrain, D. S., Jianfang, D., Matuszewich, L., Lumley, L. A., Putnam, S. K. y Moses, J. (1999). Hormone-neurotransmitter Interaction in the Control of Sexual Behavior. *Behavioural Brain Research*, 105: 105-116.

- Hull, E., Du, J., Lorrian, D. y Matuszewich L. (1997). Testosterone, Preoptic Dopamine, and Copulation in Male Rats. *Brains Research Bulletin*, 44: 327- 333.
- Hull, E., Wood, R., McKenna, K. (2006). Neurobiology of Male Sexual Behavior. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Chapter 33, 1729- 1824.
- Jacob, T. C., Moss, S. J. y Jurd, R. (2008). GABA_A Receptor Trafficking and its Role in the Dynamic Modulation of Neuronal Inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*.: 9, 331-343.
- Juárez, J. y Corsi-Cabrera, M. (1995). Sex Differences in Interhemispheric Correlation and Spectral Power of EEG Activity. *Brain Research Bulletin*, 38: 149-151.
- Juárez, J., Corsi-Cabrera, M. y Del Río-Portilla, I. (1995). Effects of Prenatal Testosterone Treatment on Sex Differences in the EEG Activity on the Rat. *Brain Research*, 694: 21-28.
- Justel, N. Bentosela, M. y Ruetti, E. (2010). Testosterona, Emoción y Cognición: Estudios en Animales Castrados. *Interdisciplinaria*, 27: 191-208.
- Justel, N., Bentosela, M. y Mustaca, A. E. (2009). Comportamiento Sexual y Ansiedad. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 41: 429-444.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. (2001). Principios en Neurociencia. McGraw-Hill Interamericana de España.

- Kardos, J. (1999) Recent advances in GABA research. *Neurochemistry International*, 34: 353-358.
- Katsura, M., Shibasaki, M., Kurokawa, K., Tsujimura, A. y Ohkuma, S. (2007). Upregulation of L-type High Voltage-gated Calcium Channel Subunits by Sustained Exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in Cerebrocortical Neurons. *Journal of Neurochemistry*, 103: 2518-2528.
- King, S. R. (2008). Emerging Roles of Neurosteroids in Sexual Behavior and Function. *Journal of Andrology*, 29: 524-532.
- Kokras, N., Dalla, C., Sideris, A. C., Dendi, A., Mikail, H. G., Antoniou, K. y Papadopoulou-Daifoti, Z. (2012). Behavioral Sexual Dimorphism in Models of Anxiety and Depression due to Changes in HPA Axis Activity. *Neuropharmacology*, 62: 436-445.
- Korte, S. M. (2001). Corticosteroids in Relation to Fear, Anxiety and Psychopathology. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 25: 117-142.
- Krnjević, K. (1991). Significance of GABA in Brain Function. En: G. Tunnucliff & B.U. Raess, (Eds.), *GABA Mechanism in Epilepsy*. (pp. 47-87). Ney York: Wiley-Liss, Inc.
- Krnjević, K. (1984). Neurotransmitters in Cerebral Cortex: a General Account. En: E. G. Jones & A. Peter (Eds.), *Cerebral Cortex, Vol. 2. Functional Properties of Cortical Cells*. (pp.39-61), New York: Plenum Press.

- Krogsgaard- Larsen, P., Falch. E., Larsson, O., y Schousboe, A. (1987). GABA Uptake Inhibitors: Relevance to Antiepileptic Drug Research. *Epilepsy Research*,1. 77-93.
- Kubli-Garfias, C., Canchola, E., Arauz-Contreras, J., y Feria-Velazco, A. (1982). Depressant Effect of Androgens on the Cat Brain Electrical Activity and its Antagonism by Ruthenium Red. *Neuroscience*, 7: 2777-2782.
- Kuffler, S., Nichols, J. & Martin, A. (1984). From Neuron of the Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System. Massachussetts: Sinauer Associated.
- Lader, M. y File, S. (1987). The Biological Basis of Benzodiazepine Dependence. *Psychology Medical Journal*, 17: 537-547.
- Larsson, K. & Heimer, L. (1964) "Mating Behavior of Male Rats after Lesions in the Preoptic Area". *Nature*, 202: 413-414.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review Neuroscience*, 23: 155- 184.
- LeDoux, J.E. (2007). The Amydala. *Current Biology*, 17: R868- R874.
- LeGal La Salle, G., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R. (1988). Local Asymptomatic Status Epilepticus Induced by Withdrawal of GABA Infusion into Limbic Structures. *Experimental Neurology*, 101: 411-417.

- Liu, Q., Mandiyan, S., Nelson, H. & Nelson, N. (1992). A Family of Genes Encoding Neurotransmitter Transporters. *Proceedings of the National Academy of Science*, 89: 6639-6643.
- Lucio, R. y Tlachi- López. (2008). Análisis de la Cópula y el Eyaculado de la Rata Albina (*Rattus Norvegicus*): Manual de Laboratorio. México: Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Macdonald, R. y Olsen, R. (1994). GABA_A Receptor Channels. *Annual Review Neuroscience*, 17: 569-602.
- Martínez-Mota, L. Cruz-Martínez, J. J., Márquez-Baltazar, S. y Fernández-Guasti, A. (2008). Estrogens Participate in the Antidepressant-like Effect of Desipramine and Fluoxetine in Male Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 88: 332-340.
- Martínez-Mota, L., Ulloa, R. E., Herrera-Pérez, J., Chavira, R. y Fernández-Guasti, A. (2011). Sex and Age Differences in the Impact of Forced Swimming Test on the Level of Steroid Hormones. *Physiology and Behavior*, 104: 900-905.
- Martínez-Mota, L., y Fernández-Guasti, A. (2004). Testosterone-dependent Antidepressant-like Effect of Noradrenergic but not of Serotonergic Drugs. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78: 711-718.

- Martín-García E, Darbra S, Pallarès M. (2007) Implicaciones de los Neuroesteroides en la Conducta Normal y Patológica. Revisión en *Neurociencias* 44; 661-676.
- McKernan, R. & Whiting, P. (1996). Which GABA_A receptors Subtypes Really Occur in the Brain? *Trends Neuroscience*, 19: 139-143.
- McLellan, A. T.; O'Brien, C. P.; Metzger, D.; Alterman, A. I.; Cornish, J.; Urschel, H. How Effective is Substance Abuse Treatment—Compared to what? En: O'Brien, C. P. (Ed); Jaffe, J. H. (Ed), (1992). *Addictive States Research Publications: Association for Research in Nervous and Mental Disease*, Vol. 70. (pp. 231-252). New York, NY, US: Raven Press: 231-252.
- Menini, Ch., Mraovitch, S., Calando, Y., De La Sayette, V., Silva- Barrat, C., Brailowsky, S. y Seylaz, J. (1991). Metabolic Anatomy of the Local Epilepsy Produced by Cessation of Chronic Intracortical GABA Infusion in the Rat. *Neuroscience*: 41: 607-615.
- Miguel, A. (2012). *Administración Crónica de Diazepam como Promotor de Conductas Adictivas a Drogas en la Edad Adulta de la Rata*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNBAM, Ciudad de México, México.
- Möhler, H. (2012). The GABA System in Anxiety and Depression and its Therapeutic Potential. *Neuropharmacology*, 62: 42-53.

- Montiel, T., Almeida, D., Rango, I., Calixto, E. Casasola, C. y Brailowsky, S. (2000). Long- Lasting Effects of GABA Infusion into the Cerebral Cortex of the Rat. *Neuroplasticity*, 7: 1-2.
- Montouris, G. y Morris, G. L. (2005). Reproductive and Sexual Dysfunction in Men with Epilepsy. *Epilepsy and Behavior*, 7: S7-S14.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D. y Rodwell, V. (2001). *Bioquímica de Harper*. México: Manual Moderno.
- Nelson, H, Mandiyan, S. & Nelson, N. (1990). Cloning of the Human Brain GABA Transporter. *FEBS Letters*, 269: 181-184.
- Nishimura, H., Tsuda, A., Oguchi, M., Ida, Y. y Tanaka, M. (1987). Is Immobility of Rats in the Forced Swimming Test “Behavioral Despair?”. *Physiology and Behavior*, 42: 93-95.
- Nurse, S. & Lacaille, J. (1997). Do GABA_A and GABA_B Inhibitory Postsynaptic Responses Originate from Distinct Interneurons in the Hippocampus? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75: 520-525.
- Olney, J.W., Collins, R.C. y Sloviter, R.S. (1986). Excitotoxic Mechanisms of Epileptic Brain Damage. *Advances in Neurology*, 44:857-877.
- Olsen, R. & Tobin, A. (1990). Molecular Biology of GABA_A Receptors. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4: 1469-1480.

- Olsen, R. (2000). GABA is the Major Inhibitory Neurotransmitter in the Nervous System. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, 12: 159-168.
- Olsen, R. W. (2002). GABA is the Major Inhibitory Neurotransmitter in the Nervous System. En: L. D. Kenneth, D. Charney, J. T. Coley & Ch. Nemeroff. (Eds.). *Psychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*. California: American College of Neuropsychopharmacology, 159-168.
- Paredes, R. G. y Agmo, A. (1991). GABA and Behavior: The Role of Receptor Subtypes. *Neuroscience and Behavior Reviews*, 16: 145-170.
- Paredes, R. G., Haller, A., Manero, M., Alvarado, R. y Agmo, A. (1990). Medial Preoptic Area Kindling Induces Sexual Behavior in Sexually Inactive Male Rats. *Brain Research*. 515: 20-26.
- Paredes, R. G., Karam, P., Highland, L. y Agmo, A. (1997). GABAergic Drugs and Socio-Sexual Behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58: 291- 298.
- Parker, K.; Lazo, J. y Brunton L. (2006). Goodman&Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. México: Mc Graw Hill Interamericana.
- Paul, S.M. (1995). GABA and Glycine. En: F. E. Bloom & Kuper, D. J. (Eds.) *Psychopharmacology: the Fourth Generation of Progress*. New York : Raven, pp. 87-89.

- Paxinos, G. y Watsonm, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. y Briley, M. (1985). Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.
- Perachio, A., Marr, L.D. y Alexander, M. (1979). "Sexual Behaviour in Male Rhesus Monkeys Elicited by Electrical Stimulation of Preoptic and Hypothalamic Areas". *Brain Research*, 177: 127-144.
- Perkins, K. L. & Wong, R. K. (1997). The Depolarizing GABA Response. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacolpgy*, 75: 516-519.
- Petty, F., Kramer, G.L. y Rush, A.J. (1994). Low Plasma GABA is a Stable Trait Marker of Mood Disorder. *Biological Psychiatry*, 35: 615- 747.
- Pfaus, J. G., Wilkins, M. F., DiPietro, N., Benibgui, M., Toledano, R., Rowe, A. y Castro, M. (2010). Inhibitory and Desinhibitory Effects on Psychomotor Stimulants and Depressants on the Sexual Behavior of Male and Female Rats. *Hormones and Behavior*: 58, 163-176.
- Picazo, O., Estrada-Camarena, E. y Harnández-Aragón, A. (2006). Influence of the Post-Ovariectomy Time Frame on the Experimental Anxiety and the Behavioural Actions of some Anxiolytic Agents. *European Journal of Pharmacolgy*, 530: 88-94.

- Pisu, M. G. y Serra, M. (2004). Neurosteroids and Neuroactive Drugs in Mental Disorders. *Life Sciences*, 74: 3181-3197.
- Porsolt, R. D., Anton, G. Blavet, N. y Jalfre M. (1978). Behavioural Despair in Rats: a New Model Sensitive to Antidepressant Treatments. *European Journal of Pharmacology*. 47: 379- 371.
- Purves, D., Augustine G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A.-S. McNamara, J. O. & Williams, S. M. (2006). Neurociencia. México: Panamericana. pp. 156- 160.
- Qureshi, G. y Söderstern, P. (1986). Sexual Activity Alters the Concentration of Amino Acids in the Cerebrospinal Fluid on Male Rats. *Neuroscience Letters*, 70: 374- 378.
- Ramsden, M., Shin, T. M. y Pike, C. J. (2003). Androgens Modulate Neuronal Vulnerability to Kainate Lesion. *Neuroscience*, 122: 573-578.
- Reddy, D. S. (2004). Testosterone Modulation of Seizure Susceptibility is Mediated by Neurosteroids 3 α -Androstanediol and 17 β -Estradiol. *Neuroscience*, 129: 195-207.
- Redolar, D. (2008). *Cerebro y Adicción*. Recuperado de: <http://books.google.com.mx/books?id=WTzLYyEkVj0C&pg=PA33&dq=tolerancia+condicionada&hl=es&sa=X&ei=ih71T9HUIajC2wXTgrDmBg&ved=0CD8Q6wEwAw#v=onepage&q=tolerancia%20condicionada&f=false>

- Rodgers, R.J. y Dalvi, A. (1997). Anxiety, Defense and the Elevated Plus-Maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21 (6): 801-10.
- Ruano D, Cano J, Machado A, Vitorica V. (1991) Pharmacologic characterization of GABA_A/benzodiazepine Receptor in Rat Hippocampus During Aging. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256: 902-908.
- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. y Tapia, R. (1994). Decrease of Glutamate Descarboxilase Activity after *IN VIVO* Cortical Infusion of γ -Aminobutiric Acid. *Neurochemistry*: 24, 363- 368.
- Samba, D. y Jian, K. (2010). The Testosterone-Derived Neurosteroid Androstanediol is a Possitive Allosteric Modulator of GABA_A Receptors. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334: 1031-1041.
- Scharman, H.E. y MacLusky, N.J. (2006). The Influence of Gonadal Hormones Neuronal Excitability, Seizures, and Epilepsy in the Female. *Epilepsia*, 47: 1423-1440.
- Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, R., Franklin, R. J. M., García-Segura, L. M., Lambert, J. J., Mayo, W., Melcangi, R. C., Parducz, A., Suter, U., Carelli, C., Baulieu, E. E., Akwa, Y. (2003). Steroid Hormones and Neurosteroids in Normal and Pathological aging the Nervous System. *Progress in Neurobiology*, 71: 3-29.

- Silva-Barrat, C., Szente, M., Menini, C., Velluti, J. C. y Champagnat, J. A. (2001). Muscarinic Depression of Synaptic Transmission in the Epileptogenic GABA Withdrawal Syndrome Focus. *Journal of Neurophysiology*, 85: 2159-2165
- Silva-Barrat, C. y Champagnat, J. A. (1995). Potassium Current Controls Burst Termination in Rat Neocortical Neurons after GABA Withdrawal. *Neuroscience Letters*, 189(2): 105-108.
- Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J., Naquet, R. (1992). Burst Generation in Neocortical Neurons after GABA Withdrawal in The Rat. *Journal of Neurophysiology*, 67: 715-727.
- Silva-Barrat, C., Velluti, J., Szente, M., Batini, C. y Cahmpagnat, J. (2005). Exaggeration of Epileptic-Like Patterns by Nicotine Receptor Activation during the GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Research*, 1042(2): 133-143.
- Silva-Barrat, Champagnat, J., Brailowsky, S., Menini, C., Naquet, R. (1989). Relationship between Tolerance to GABA_A Agonist Bursting Properties in Neocortical Neurons during GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Research*, 498: 289-298.
- Smith, S., Shen H., Hua, Q. y Zhou, X. (2007). Neurosteroid Regulation of GABA_A Receptor: Focus on the $\alpha 4$ and δ subunits. *Pharmacology & Therapeutics*, 116: 58-76.

- Staley, K. & Proctor, W. (1999) Modulation of Mammalian Dendritic GABA_A Receptor Function by the Kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ Transport. *Journal of Physiology*, 519: 693-712.
- Staley, K., Soldo, B.L. & Proctor, W.R. (1995). Ionic Mechanisms of Neuronal Excitation by Inhibitory GABA_A Receptors. *Science*, 269: 977-981.
- Stoffel-Wagner, B. (2001). Neurosteroids Metabolism in the Human Brain. *European Journal of Endocrinology*, 145: 669-679.
- Tapia R, Sandoval M, y Contreras P. (1975) Evidence for a role of glutamate descarboxilase activity as a regulatory mechanism of cerebral excitability. *Journal of Neurochemismestry* 12: 1283-1285
- Tapia, R. y Sandoval, M. E. (1971). Study of Inhibition of Brain of Glutamate Descarboxilase by Pyridoxal Phosphate Oxime -O-acetic Acid. *Journal of Neurochemismestry*, 18: 2051-2059.
- Toth, E., Gersner, R., Wilf-Yarkoni, A., Raizel, H., Dar, D. E., Richter-Levin G., Levit, O. y Zangen, A. (2008). Age-dependent Effects of Chronic Stress on Brain Plasticity and Depressive Behavior. *Journal of Neurochemistry*, 107: 522-532.
- Uussi-Okari, M. y Korpi, E. (2010). Regulation of GABA_AReceptor Subunit Expression by Pharmacological Agents. *Pharmacological Review*, 62:97–135.

- Verroti, A., Loiacono, G., Laus, M., Coppola, G., Chiarelli, F. y Tiboni, G. (2011). Hormonal and Reproductive Disturbances in Epileptic Male Patients: Emerging Issues. *Reproductive Toxicology*, 31: 519-527.
- Vollenweider, I., Smith, K., Keist, R. y Rudolph, U. (2011). Antidepressant-like Properties of $\alpha 2$ -containing GABA_A Receptors. *Behavioural Brain Research*, 217: 77-80.
- Will, B., Toniolo, G., Brailowsky, S. (1988). Unilateral Infusion of GABA and Saline into the Nucleus of Rats: 1. Effect on Motor Function and Brain Morphology. *Behavioural Brain Research*, 27: 123-129.
- Willner, P. (1966). Validation Criteria for Animal Models of Human Mental Disorders: Learned Helplessness as a Paradigm Case. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 10: 677-690.
- Zandio, M., Ferrín, M. y Cuesta, M. J. (2002). Neurobiología de la Depresión. *ANALES del Sistema Sanitario de Navarra*, 25: 43-62.
- Zhen, P. (2009). Neuroactive Steroid Regulation of Neurotransmitter Release in the CNS: Action, Mechanism and Possible Significance. *Progress in Neurobiology*, 89: 134-152.