



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Análisis de la expresión de c-Fos en diversas regiones cerebrales  
en ratas con tolerancia farmacológica y asociativa a los efectos  
ansiolíticos del diazepam**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**  
**P R E S E N T A (N)**

**Daniel Jeronimo González Sánchez**

**Directora: Dra. Sara Eugenia Cruz Morales**

**Dictaminadores: Dr. Florencio Miranda Herrera**

**Mtra. Norma Laura García Saldívar**



**Los Reyes Iztacala, Edo de México, 10/08/2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Al equipo del departamento de psicofarmacología de la UIICSE, FES-Iztacala, UNAM. Un especial agradecimiento a la Dra. Sara Eugenia Cruz Morales, a quien aprecio y respeto enormemente, por todo lo que he aprendido, y por la confianza y paciencia que me ha tenido. A Georgina Castillo, María Reyes y Norma García, por su apoyo para la realización de este proyecto, y por todos los momentos y conocimiento compartidos. Al Dr. Florencio Miranda y al Dr. Pedro Arriaga, por sus observaciones. También a Cibela Estrada y Carolina Morán de la BUAP.

Finalmente agradezco a UNAM DGAPA, PAPIIT que por medio del proyecto IN307711 hizo posible este trabajo.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>1 APRENDIZAJE</b>	7
1.1 Aprendizaje no asociativo	7
1.1.1 Habitación y sensibilización	7
1.2 Aprendizaje asociativo	9
1.2.1 Condicionamiento Clásico	9
1.2.2 Condicionamiento Operante	13
<b>2 TOLERANCIA A LAS DROGAS</b>	17
2.1 Tolerancia aguda y crónica	18
2.2 Tolerancia asociativa	19
<b>3 ANSIEDAD</b>	23
3.1 Bases biológicas de la ansiedad	23
3.1.1 GABA	28
3.1.2 Receptores GABA	29
<b>4 BENZODIAZEPINAS</b>	31
4.1 Farmacología y benzodiazepinas	31
4.2 Farmacodinamia y farmacocinética de las benzodiazepinas	32
<b>5 MODELOS EXPERIMENTALES DE ANSIEDAD. EL LEC (LABERINTO ELEVADO EN CRUZ)</b>	34
<b>6 EL PROTOONCOGEN C-FOS</b>	39
6.1 Inmunohistoquímica	40
<b>7 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES</b>	41
7.1 Tolerancia a las BDZ	41
7.2 Expresión del gen c-Fos	42
<b>8 EXPERIMENTO</b>	46
8.1 Justificación	46
8.2 Hipótesis	46
8.3 Objetivo	46
8.4 Método	47
8.4.1 Metodología	47
8.4.2 Procedimiento	48
8.4.3 Análisis de datos	52

<b>9</b>	<b>RESULTADOS</b>	53
9.1	Conductuales	53
9.2	Inmunohistoquímica	55
<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	59
<b>11</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	70
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS</b>	72
<b>APÉNDICE</b>		78

## RESUMEN

El diazepam (D) pertenece a un grupo de fármacos que tienen un uso muy extendido, las benzodiazepinas, cuyo sitio de acción son los receptores GABA-A, y que producen efectos anticonvulsivos, sedantes y ansiolíticos entre otros. La administración repetida de D puede producir tolerancia, que puede ser de tipo asociativo. Se ha utilizado a menudo el Laberinto Elevado en Cruz (LEC), para medir ansiedad y su relación con el D. Esto se puede ver acompañado de cambios en la actividad neuronal, que puede ser analizada por medio de la expresión del gen c-Fos.

En este trabajo se utilizó el LEC, para evaluar el efecto agudo y el desarrollo de tolerancia al D, y se analizó la expresión de c-Fos en estructuras relacionadas con la ansiedad: corteza prefrontal, cuerpo estriado, hipotálamo, complejo amigdalino, hipocampo y tallo. Se utilizaron ratas macho Wistar (270 gr al día del experimento), asignadas a 5 grupos independientes, inyectados con salina (S) o D (1mg/kg, ip), en bioterio (B) o laboratorio (L), y evaluados en LEC. Los grupos fueron: control salina (S), dos grupos con administración aguda de D (ADB, ADL) y dos con tratamiento crónico de 21 administraciones de D (CDB y CDL), el día 21 se probaron en LEC y dos horas después los sujetos se sacrificaron, se extrajeron los cerebros y se sometieron al procedimiento de inmunohistoquímica.

La administración aguda produjo efecto ansiolítico y disminución significativa de la expresión de c-Fos en ambos contextos. En la administración crónica se encontró tolerancia asociativa. En la expresión de c-Fos se encontró inhibición por administración aguda al D, pero cuando se administró de forma crónica hubo una recuperación en la expresión de c-Fos tendiendo a ser mayor en el contexto asociado a la administración de D, siendo esto congruente con lo encontrado en la tolerancia al efecto ansiolítico en la tarea de LEC. En conclusión, los resultados sugieren la participación de la expresión de c-Fos en los mecanismos neuronales de ansiedad, de forma análoga a lo observado en el LEC, aunque con una mediación asociativa no tan significativa en la respuesta biológica de c-Fos.

# INTRODUCCIÓN

Se sabe que todo cambio en el comportamiento relativamente duradero es entendido como aprendizaje y hay formas de aprendizaje no asociativo y asociativo, en éste último participan señales ambientales que pueden ser manipuladas para entender mejor los mecanismos en que se aprende una conducta determinada.

Normalmente el organismo tiende a mantenerse en homeostasis, así que si se presenta un evento que cause alteración en su equilibrio, el organismo aprenderá a responder eficientemente para recuperarlo. El efecto ansiolítico del D disminuye tras repetidas administraciones, a esto se le suele llamar tolerancia, la cual es influida en gran medida por las señales ambientales que anteceden al efecto de la droga, lo cual ha sido comprobado en diversas ocasiones. El laberinto elevado en cruz es un modelo experimental ampliamente usado por su sensibilidad a las benzodiazepinas, dicho modelo es muy útil para observar los cambios conductuales inducidos por el D.

Se han realizado diversos trabajos en los que se ha utilizado alguna técnica de marcaje para estudiar la relación entre actividad neuronal y comportamiento, una de las técnicas más utilizada es la inmunohistoquímica, esta técnica ha sido empleada para marcar la proteína Fos, resultante de la transcripción del gen c-Fos y su traducción.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se analiza la participación de señales ambientales en el desarrollo de tolerancia asociativa a las benzodiazepinas, tomando en cuenta el desempeño en una tarea de laberinto elevado en cruz y la expresión del gen c-Fos en diversas estructuras neuronales relacionadas con la ansiedad.

# 1 APRENDIZAJE

El aprendizaje es entendido como un cambio duradero en los mecanismos del comportamiento, que implica estímulos y/o respuestas resultantes de una experiencia previa con estímulos y respuestas similares. Si el cambio observado en el mecanismo de comportamiento no perdura o no es resultado de la experiencia con eventos ambientales específicos no puede ser considerado como aprendizaje. Los cambios en el mecanismo de comportamiento resultantes de la experiencia suelen explicarse por medio de la asociación de estímulos y respuestas resultantes de la experiencia; se puede encontrar evidencia de aprendizaje en un cambio en el comportamiento como la ejecución de una nueva respuesta o la supresión de una respuesta previa, pero hay que ser cuidadoso porque el comportamiento en sí mismo no puede ser considerado una prueba de aprendizaje, hay casos en los que los cambios observados en el comportamiento se deben a la fatiga, a una alteración fisiológica o estado motivacional, a la maduración, o a la evolución; es el cambio en los mecanismos que subyacen al comportamiento los que aportan realmente la evidencia del aprendizaje (Domjan, 2010).

El aprendizaje puede ser clasificado en dos categorías generales: no asociativo y asociativo.

## 1.1 Aprendizaje no asociativo

Este tipo de aprendizaje se refiere a una forma de adaptación simple que consiste en el inicio y/o incremento o la reducción y/o cese de una respuesta ante un estímulo. De tal modo se pueden identificar dos procesos específicos: habituación y sensibilización.

### 1.1.1 Habituación y sensibilización

Los efectos de la habituación y la sensibilización son productos finales de procesos que ayudan a organizar y focalizar el comportamiento entre la gran cantidad de estímulos a los que se está expuesto, dichos efectos son tipos básicos de cambio en el comportamiento, producto de experiencias previas, aunque de tipo

no asociativo (Domjan, 2010). La noción de habituación es muy antigua pero el uso del término se realizó de manera amplia en el siglo XIX, antes de esto se utilizaron diversos términos para referirse a la habituación como “aclimatación”, “acomodación”, “adaptación negativa”, “fatiga”, “extinción” e “inactivación estimuladora”; se han realizado diversos estudios sobre el fenómeno de habituación en muchos organismos, desde amebas hasta humanos (Thompson, 2009). La habituación consiste en la disminución de una respuesta desencadenada, después de presentar el estímulo desencadenador de manera repetida, sin implicar una incapacidad sensitiva o motora momentánea (Domjan, 2010).

Hay nueve propiedades que dan una definición operatoria a la respuesta de habituación (Grissom & Bhatnagar, 2009): 1) Un estímulo particular desencadena una respuesta y la presentación repetida de ese estímulo resulta en el decremento de la respuesta (habituación); 2) si el estímulo es suspendido la respuesta tiende a recuperarse después de algún tiempo (recuperación espontánea); 3) si se repite el entrenamiento de habituación y recuperación espontánea, la habituación se vuelve más rápida (potenciación de la habituación); 4) Entre más rápida sea la frecuencia de estimulación, más rápidamente se desarrolla la habituación; 5) La habituación es más rápida y evidente con el estímulo más débil, en cambio un estímulo más intenso puede provocar que la habituación sea menos significativa; 6) Los efectos de la habituación pueden superar el nivel de respuesta nula; 7) La habituación de una respuesta a un estímulo dado puede mostrar generalización a otros estímulos; 8) Al presentar un estímulo, por lo regular más intenso que el habituado, se observa una recuperación de la respuesta habituada (deshabituación); 9) La presentación repetida del estímulo de deshabituación resulta en la habituación de dicho estímulo (podría ser llamado habituación de la deshabituación).

En cuanto a la sensibilización, para Domjan (2010) es un proceso que interactúa con la habituación, mientras que esta última consiste en la disminución de la respuesta, la sensibilización se caracteriza por el aumento de la disposición respuesta ante un estímulo, en ella participan celular nerviosas que determinan el

estado general de sensibilidad y preparación para una respuesta, por ejemplo la respuesta de sobresalto ante un breve ruido intenso o la respuesta de orientación visual ante una imagen compleja, el efecto de sensibilización no se presenta ante cualquier situación, sólo los eventos de tipo excitador provocan este tipo de cambio en el comportamiento.

## **1.2 Aprendizaje asociativo**

La asociación es un mecanismo fundamental en diversas funciones del organismo como el aprendizaje, la memoria, la modificación adaptativa de la conducta, la adquisición de conocimiento y la organización de la memoria. En lo estudiado sobre aprendizaje asociativo se ha encontrado una generalidad, de los principios y mecanismos que lo rigen en diversas especies, desde humanos hasta invertebrados (Aguado-Aguilar, 2001). La importancia de la asociación se ha comprobado en la psicología, el principio básico del estudio de la conducta se basa en las relaciones asociativas con estímulos que anteceden o proceden a la conducta; se sabe además, que un estímulo puede desencadenar una respuesta refleja de forma directa, también se sabe que otro estímulo que no se relacione de forma directa con la respuesta refleja también la puede evocar, y esto es mediado por la asociación (Domjan, 2010).

A continuación se hace mención de las teorías más representativas del aprendizaje asociativo: “condicionamiento clásico” y “condicionamiento operante”.

### **1.2.1 Condicionamiento Clásico**

Ivan Petrovich Pavlov desarrolló el “condicionamiento clásico”, en el que fundamenta las leyes asociativas que dan cuenta del aprendizaje de los organismos, en la teoría del condicionamiento pavloviano la percepción de estímulos juega un papel muy importante, sus estudios se fundamentan en la observación de la activación y modulación de la conducta refleja de los organismos, se establece que la excitación refleja puede ser generada, después de un proceso de

condicionamiento, por estímulos que normalmente no provocan dichas respuestas reflejas (Hilgard y Bower, 1973).

El condicionamiento clásico o reflejo, consiste en la asociación de estímulos permitiendo que un estímulo que normalmente no evoca una respuesta refleja lo haga después de un proceso de asociación; inicialmente se presenta un estímulo que evoca una respuesta refleja, al estímulo se le da el nombre de estímulo incondicionado (EI) debido a su naturaleza innata para evocar una consecuencia específica, a la cual se le da el nombre de respuesta incondicionada (RI), que invariablemente se presenta ante el EI sin una mediación voluntaria del organismo; en el proceso de condicionamiento se presenta de forma contingente al EI un estímulo neutro (EN) que por sí mismo no evoca ninguna respuesta o al menos evoca una respuesta diferente a la RI, por ejemplo, si EI es un alimento, que provoca salivación, el EN podría ser un sonido, que provoca orientación; después de la asociación entre el EN y el EI, el EN adquiere la capacidad de producir una respuesta igual o similar a la RI, para entonces el EN es llamado estímulo condicional (EC) y la respuesta es nombrada: respuesta condicionada (RC), de éste modo el organismo ha aprendido a emitir una respuesta de forma condicional a la presencia de un estímulo específico, por ejemplo, en un estudio Pavlov le presentó comida a perros o les inyectaba ácido diluido en la boca, eso provocaba la respuesta refleja de salivación, estos estímulos fueron asociados con un EN (sonido), después de varios ensayos el EC, logró evocar por sí mismo la respuesta de salivación o RC (Pavlov, 1927).

Algunos conceptos básicos relevantes del condicionamiento clásico son los siguientes (Ellis-Ormrod, 2001; Hilgard y Bower, 1973):

- Reforzamiento. Consiste en el uso del mecanismo de condicionamiento para aumentar la probabilidad de evocación de una respuesta. Entre más veces se presente EN junto con EI más

probablemente se evocará una respuesta igual o similar a RI ante el EN.

- Extinción. Consiste en la presentación repetida del estímulo condicionado sin presentar el estímulo reforzador, lo que causa un debilitamiento de la respuesta condicionada.
- Recuperación espontánea. Consiste en la reaparición de la respuesta condicionada después de un periodo de descanso desde que ocurrió la extinción. La respuesta que aparece en la recuperación espontánea suele ser más débil que la respuesta condicionada original y se extingue más rápido.
- Generalización. La respuesta condicionada puede ser evocada por diversos estímulos aun cuando sus características no sean parecidas entre sí. La actividad en el sistema nervioso central (SNC) consiste en una excitación generalizada de la corteza.
- Discriminación. Es un concepto complementario de la generalización que consiste en una respuesta diferenciada lograda por el reforzamiento de un estímulo específico, pues cuando se presenta un estímulo diferente al que se desea reforzar este no se refuerza. La actividad en SNC es presentada en una concentración de la excitación a diferencia de la generalización.
- Inhibición. Es cuando se interfiere y/o disminuye la respuesta condicionada, hay dos categorías: externa e interna. En la inhibición externa un estímulo externo diferente a EC se presenta y es más intenso, entonces se reduce la capacidad de respuesta. En la inhibición interna se modifica la probabilidad de ocurrencia de la respuesta ante el estímulo condicionado, algunos procedimientos que

han sido empleados para ello son: extinción, inhibición diferencial, inhibición condicionada e inhibición por demora; en la extinción, como ya se mencionó, se deja de reforzar y la respuesta condicionada disminuiría; en la inhibición diferencial se refuerza sólo un estímulo con características específicas, por ejemplo un tono con una duración específica, de este modo se observaría que la respuesta sólo se presentaría ante dicho tono, aun cuando el sonido es el mismo cesaría de presentarse ante tonos de diferente duración; en la inhibición condicionada se presenta el reforzamiento sólo si se suprime una acción específica, por ejemplo, si una rata se mueve se le dan descargas eléctricas, por lo cual se observaría que la rata cesaría su movimiento; en la inhibición por demora se dejaría pasar suficiente tiempo entre la respuesta y la presentación del reforzamiento, después de un tiempo el estímulo condicionado pierde fuerza.

A continuación se hace mención de los procesos de condicionamiento (Vargas-Mendoza, 2006):

- Simultaneo. Los dos estímulos, EI y EC se presentan al mismo tiempo, con una demora entre ellos, no mayor a medio segundo.
- Demorado. Primero se presenta el EC y medio segundo después o más, se presenta el EI. Ambos se sobreponen en tiempo y normalmente terminan juntos.
- Huella. Primero se presenta el EC, este se apaga y transcurre un periodo corto antes de que se presente el EI.
- Retroactivo. En este caso los estímulos se presentan en orden inverso, primero se presenta el EI y después el EC.

- Temporal. En este procedimiento se trabaja sólo con el EI, presentándolo en periodos regulares, utilizando al tiempo entre eventos como EI.

### **1.2.2 Condicionamiento Operante**

Se considera a Watson como un elemento clave en la psicología científica, él se opuso a las concepciones mentalistas de la psicología y propuso un enfoque objetivo y experimental considerando al individuo como un organismo respondiente al entorno, con esto se forma la base del desarrollo científico para la psicología. Después Skinner busca superar las carencias del modelo watsoniano, a través de sus observaciones elabora un método descriptivo que tiene la intención de predecir y controlar el comportamiento, buscando así la aplicación de la psicología, es decir, una psicología empírica (Agudelo y Guerrero, 1973).

Edward Lee Thorndike presentó una teoría a la que llamó conexionismo, en ella se destaca la experiencia como forma de establecer conexiones entre estímulos y respuestas; en un experimento, Thorndike metió a un gato en un laberinto con una puerta, al principio el gato realizó movimientos aleatorios hasta que accidentalmente activo el mecanismo que abría la puerta para poder salir, después volvió a meter al gato, que en esa ocasión tardó menos tiempo en salir encontrando el mecanismo activador por ensayo y error, realizó ensayos sucesivos y observó que a medida que se repetía el experimento el gato tardaba menos en activar el mecanismo que abría la puerta del laberinto y permitía la salida; de ese modo Thorndike estableció que las respuestas ante una situación que son seguidas por una consecuencia satisfactoria se fortalecen, mientras que las que son seguidas por una consecuencia desagradable se debilitan; propuso que la práctica influye sobre las conexiones E-R, a medida que las conexiones estímulo-respuesta que se repiten se fortalecen, mientras que las que no se utilizan se debilitan, más adelante descartó la idea de que las consecuencias desagradables debilitan la conducta, pues cuando se presenta un castigo se pueden fortalecer otras conductas mediante la cuales se evita, también la idea de que la repetición por sí misma fortalece la conducta fue

desechada, sin embargo la ley establecida de que las consecuencias agradables que siguen a una conducta la fortalecen aún es vigente y es destacable su influencia en la teoría del condicionamiento operante desarrollada por B. F. Skinner (Ellis-Ormrod, 2005).

Skinner reconoce la existencia de un condicionamiento respondiente en el que la respuesta es refleja, no hay ejecución voluntaria del organismo y el reforzamiento es manipulado por el experimentador, pero en el condicionamiento operante ya se entiende al organismo como un ser capaz de ejercer influencia sobre su medio y el reforzamiento es ahora dependiente de la respuesta del organismo, la respuesta entonces es una actividad perceptible dirigida a un fin; en esencia el condicionamiento operante establece las bases esenciales del aprendizaje que trascienden de la filogenia, los organismos son sujetos a leyes básicas y reaccionan de una manera similar aun cuando el comportamiento específico sea diferente (Agudelo y Guerrero, 1973).

Skinner propuso que se adquieren las conductas que van seguidas de ciertas experiencias, aunque a diferencia de Thorndike, Skinner no habló de la fuerza de la conexión si no de la fuerza de la respuesta, mediante la cual se miden los efectos de las consecuencias, para ello Skinner elaboró una caja que permitía mantener en control el entorno en que los sujetos experimentales operaban, para las ratas había una palanca en el interior de la caja que al ser activada permitía la caída de alimento, para las palomas había un botón iluminado en una pared que al ser activado se presentaba una bandeja con alimento; el principio básico del condicionamiento operante es que una respuesta seguida de un reforzamiento se fortalece, al ocurrir esto la conducta cambia aumentando la frecuencia de la respuesta, por lo cual, desde el punto de vista conductista, se produce un aprendizaje (Ellis-Ormrod, 2005).

En la teoría de Skinner se establece un mecanismo que se centra en el reforzamiento como forma de influir en la conducta y la base del mecanismo del condicionamiento es la tasa de respuesta, primero se requiere la presencia de un

estímulo que anteceda a la conducta cuyo papel es el de indicar la disposición de reforzador “estímulo inicial” (EI), después se presenta la conducta “respuesta” (R), de manera contingente ocurre la consecuencia “reforzadores” (C) que son estímulos que aumentan o decrementan la probabilidad de aparición de la conducta (Moscoso, 1984; Quiroga-Romero, 1995). A continuación se detallan más el estímulo inicial y el reforzador.

Ellis-Ormrod (2005) refiere que el estímulo inicial puede servir como medio de control (control de estímulo) para la aparición de la respuesta ya que sirve como indicador del momento en que la respuesta puede ser reforzada, de esta manera cuando un estímulo antecedente aumenta la probabilidad de aparición de una respuesta se llama “estímulo discriminativo”; cuando el organismo ha aprendido a responder de una forma determinada ante el estímulo discriminativo puede ser que responda de forma similar a un estímulo parecido, a esto se le llama “generalización”; el organismo puede aprender también a responder sólo a un estímulo aun cuando haya dos similares, esto se logra reforzando la respuesta solamente cuando se presenta un estímulo E+ y no cuando se presente E-, a lo que se le llama “discriminación”. La misma autora describe que el reforzador es un estímulo o suceso que al presentarse aumenta la probabilidad de que una respuesta se repita, el mismo reforzador puede fortalecer varias conductas en diferentes situaciones; hay reforzadores primarios o secundarios, los primarios son los que tienen un efecto reforzador de forma natural y directa, mientras que los secundarios son neutros en un inicio y no tienen un efecto reforzador hasta que son asociados con estímulos que sí son reforzadores, por ejemplo, la comida es un reforzador primario y el dinero es uno secundario, de inicio el dinero no tiene un efecto reforzador hasta que es asociado con la consecución de alimento, un reforzador secundario es más fuerte en la medida en que se asocie más a menudo con un reforzador primario y entre más fuerte sea este último más potente será el reforzador secundario.

Agudelo y Guerrero (1973) mencionan que los reforzadores pueden ser de tipo positivo o negativo, el de tipo positivo se refiere a presentar un estímulo agradable o apetitivo y en el de tipo negativo se retira un estímulo normalmente desagradable o aversivo, en ambos casos, positivo y negativo, se favorece la repetición de la conducta; además también se pueden eliminar conductas indeseables, uno de los procedimientos es la extinción, consiste en no presentar el reforzador, esto provoca que la frecuencia de la conducta disminuya hasta desaparecer, sin embargo Ellis-Ormrod (2005) considera que el reforzamiento de otras conductas (RDO), en el cual se refuerzan conductas incompatibles que no permiten que la que se quiere eliminar se ejecute, es más efectivo.

Existen diferentes esquemas de reforzamiento: continuo e intermitente. En el primero se refuerza la conducta cada ocasión que esta se presente, esto ayuda a la rápida adquisición de la conducta; El reforzamiento intermitente se emplea para asegurar que la conducta permanezca y sea más difícil extinguirla. Existen diferentes tipos (Ellis-Ormrod, 2005):

- Razón.
  - Razón fija: La conducta es reforzada al cumplir un número fijo de respuestas.
  - Razón variable: El número de respuestas para conseguir el reforzamiento varía de forma aleatoria.
- Intervalo.
  - Fijo: Se refuerza la conducta cada que se cumpla una intervalo de tiempo prefijado, siempre y cuando se haya presentado la respuesta durante ese tiempo.
  - Variable: El reforzamiento se presenta después de un intervalo de tiempo que varía de forma aleatoria, siempre y cuando la respuesta se presente.

## 2 TOLERANCIA A LAS DROGAS

La tolerancia a las drogas consiste en una menor sensibilidad al efecto de la droga que resulta de la exposición a la misma (Pinel, 2007). La tolerancia es una respuesta adaptativa que se puede dar ante diversas situaciones que pongan al organismo en un estado de desequilibrio. Para Betancourt-Mainhard (2002) y Laborda (2009) la tolerancia puede ser entendida como la disminución del efecto de una misma cantidad de droga tras repetidas administraciones, o como la necesidad de aumentar la dosis administrada para conseguir el mismo efecto inicial, por lo cual Alguacil-Merino y González-Martín (2005) consideran que existe una relación positiva entre dosis y tolerancia, es decir, a mayor dosis, mayor será la tolerancia, puede hablarse de un fenómeno de desensibilización en el que se observa un decremento de la respuesta inicial para las ocasiones sucesivas en que se vuelva a suministrar el fármaco después de una o algunas administraciones. Existen algunos elementos que pueden servir para identificar los efectos de la tolerancia, pueden mencionarse tres: 1) se observa un cambio en el efecto del fármaco a medida que se realizan administraciones con la misma dosis (Trujillo, 1994); 2) al dejar de administrar una droga se presenta el síndrome de abstinencia (Laborda, 2009); y 3) los estímulos antecedentes a la administración de la droga que anticipan la administración (Trujillo, 1994). De ese modo el cambio que se observa tras la administración repetida es la disminución del efecto de la droga, lo cual se hace evidente al cesar su administración, pues se presenta el síndrome de abstinencia, que es desencadenado por la presencia de señales que se han asociado al efecto de la droga antecediendo la administración del fármaco.

La tolerancia consiste en la adaptación a los efectos de un fármaco, lo cual no ocurre de igual forma para todos los efectos del fármaco administrado, la adaptación es más rápida en unos que en otros (Alguacil-Merino y González-Martín, 2005). Para Laborda (2009) la tolerancia es selectiva, dado que la tolerancia es específica a las condiciones de consumo habitual, las señales contextuales pueden servir como estímulos discriminativos que anticipen la administración de la droga.

Alguacil-Merino y González-Martín (2005) plantean que la tolerancia está fuertemente relacionada con la dependencia, consideran que la adaptación tiene como propósito mantener al organismo en un estado de normalidad, por ello cuando se cesa de administrar la droga se observa un efecto de rebote en el que normalmente las respuestas son opuestas a los efectos del fármaco a los que el organismo se había adaptado, es como si el estado de normalidad ahora dependiera de seguir administrando la droga, de ahí que se diga que alguien se vuelve dependiente, siendo de este modo, se observa que la tolerancia y la dependencia se encuentran fuertemente relacionados.

San-Molina (2005) describe a la dependencia como la necesidad de evitar los efectos de retirada de una droga, ya que si la administración de un fármaco causa una modificación funcional en el organismo después la droga será necesaria para mantenerse en un estado de homeostasis, y si se retira la droga el organismo entrará en un estado de desequilibrio debido a que la actividad de los sistemas funcionales del organismo, después de un tiempo, se adaptan a la presencia de la droga.

## **2.1 Tolerancia aguda y crónica**

La tolerancia aguda puede ser entendida como el inicio de respuestas adaptativas en reacción a una sola administración de alguna droga (Betancourt-Mainhard, 2002). La tolerancia ocurre más claramente en unas drogas que en otras ya que la adaptación no se da de la misma manera ante todas las drogas ni ante todos los efectos de las mismas (Cedillo-Ildefonso, Arriaga y Cruz-Morales, 2008). Kissin, Brown, Robinson y Bradley (1991) demostraron el efecto de la tolerancia aguda al encontrar que con una sola administración el umbral de dolor y el efecto sedante de la morfina disminuyen aún cuando la concentración de morfina fuese alta.

La tolerancia crónica consiste en la disminución del efecto de la droga tras administraciones repetidas de la droga (Betancourt-Mainhard, 2002; Pietrzykowski

& Treistman, 2008), la tolerancia crónica normalmente se desarrolla después de varios días de administrar la misma dosis (Pietrzykowski & Treistman, 2008). Cuando una droga se administra repetidamente se nota un decremento progresivo en los efectos de la droga, a esto es a lo que se le llama tolerancia crónica y para restablecer el efecto inicial de la droga se requiere una dosis mayor (Siegel et al., 2000).

La tolerancia crónica es el resultado de los procesos compensatorios de la droga, evocados por señales que han sido asociadas al efecto de la droga (Betancourt-Mainhard, (2002).

## **2.2 Tolerancia asociativa**

La tolerancia asociativa es un mecanismo de aprendizaje que se desarrolla cuando las señales ambientales son apareadas con la administración de la droga, cuando dicha droga afecta el equilibrio homeostático produciendo cambios en, por ejemplo, la sensibilidad, presión sanguínea, ritmo cardíaco, motricidad, normalmente ocurre una adaptación a tales cambios para restaurar el estado inicial (Collett, 1998). La tolerancia asociativa se caracteriza, entre otras cosas, por presentarse ante una situación específica, lo que quiere decir que la tolerancia se manifiesta cuando las señales a las que ha sido asociado el efecto de la droga están presentes y no cuando estas están ausentes, por ejemplo, si se administra morfina en repetidas ocasiones en presencia de señales ambientales específicas el organismo desarrolla tolerancia al efecto sedante, el cual es más pronunciado ante las señales asociadas al efecto que ante señales que no fueron asociadas al efecto de la droga (Díaz-Dosque y Quezada-Scholz, 2003).

Cuando se presentan las señales que han sido asociadas a la administración de una droga el organismo responde anticipadamente, por ejemplo, un bebedor siente deseo de tomar alcohol cuando se encuentra en las condiciones en las que regularmente lo hace, las señales del ambiente asociadas al consumo son las que evocan esa respuesta. Otro ejemplo es el caso de veteranos de Vietnam adictos a

la heroína, se comprobó que el cambio de contexto (regreso a su país) favoreció la abstinencia prolongada (Siegel, 1999). Si las señales que anticipan la respuesta se presentan sin ser acompañadas por la droga se desencadenan las respuestas compensatorias, lo cual se suele llamar síndrome de abstinencia, tanto la tolerancia como el síndrome de abstinencia son parte del mismo mecanismo, los síntomas de la abstinencia son desencadenados por las mismas señales que producen la tolerancia (Betancourt-Mainhard, 2002).

Diversas señales pueden ser utilizadas como predictores de la administración de una droga, una droga puede servir como estímulo predictor de otra, por ejemplo, se ha administrado sulfato de atropina antes de administrar pentobarbital, a esto se le llama “asociación inter-droga”; se ha encontrado también que una dosis pequeña puede funcionar como predictor de una dosis más grande de la misma droga, esto ha sido visto en experimentos con etanol y se le ha llamado “asociación intra-droga”; además se puede hallar también algo que se ha llamado “asociaciones intra-administración”, lo que se refiere a que la administración *per se* funciona, junto con los estímulos ambientales, como estímulo condicionado, por ejemplo, en un experimento se encontró que al cambiar la vía de administración después de haber administrado morfina en repetidas ocasiones, la tolerancia fue menor que en otro grupo en el que no se cambió la vía de administración (Siegel, 1999).

El mecanismo de asociación de señales que modula la tolerancia puede ser explicado mediante el condicionamiento pavloviano: la administración repetida de una droga causa cambios en el comportamiento como consecuencia de un proceso de condicionamiento (Cedillo-Ildefonso et al., 2008); la activación de los receptores específicos de alguna droga, es decir, el efecto de la droga, equivale al EI, la respuesta biológica que compensa el efecto de la droga es la RI y las señales ambientales que preceden a la aplicación de la droga son EN que al ser asociados con la administración de la droga se vuelven EC. La presencia de las respuestas farmacológicas condicionadas pueden ser corroboradas presentando los EC sin la administración de la droga, lo cual puede hacerse siguiendo el procedimiento de

aplicación de la droga pero en lugar de ella aplicar una sustancia inerte (salina, por ejemplo), y las respuestas evocadas son RC, que al ser compensatorias al efecto de la droga se conocen mejor como RCC (respuestas condicionadas compensatorias) (Siegel et al. 2000; Siegel & Ramos, 2002). La tolerancia se atribuye a las RCC, normalmente opuestas al efecto de la droga, que intervienen para mantener al organismo en homeostasis atenuando el efecto de la droga, el aprendizaje tiene un rol esencial dado que una vez que los estímulos ambientales han sido asociados a la administración de la droga el organismo es capaz de anticiparse a sus efectos; la tolerancia es entonces el producto de RCC evocadas por estímulos asociados al efecto de la misma (Betancourt-Mainhard, Inostroza-Parodi y Laborda-Rojas, 2008). Es cierto también que las RC de la administración de un fármaco también pueden ser similares a los efectos de la droga, a este tipo de respuestas se le llama miméticas, el que una RC sea compensatoria o mimética del fármaco depende de su sitio de acción (Trujillo, 1994)

El desarrollo de tolerancia puede potenciar el riesgo del efecto letal de la droga, si esta se administra de forma habitual en un contexto determinado en el que se presentan RCC y en algún momento el contexto cambia, las RCC no se presentarán por falta de las señales discriminativas provocando que el individuo no soporte la dosis que habitualmente se administra en el contexto donde son evocadas las RCC, muchos casos de sobredosis están relacionados con un cambio en las señales asociadas a la droga (Siegel et al., 2000). Lo anterior ha sido dramáticamente demostrado por los efectos letales de la “sobredosis”, de acuerdo con Siegel y Ramos (2002) existen adictos que han muerto poco después de aplicarse una dosis de heroína, a pesar de la tolerancia desarrollada a los efectos depresivo respiratorios de la heroína las personas mueren por depresión respiratoria, otro ejemplo es que los que han muerto por supuesta sobredosis son adictos que se han administrado grandes cantidades de heroína, lo cual indica un uso prolongado de la droga, y no presentan concentraciones de heroína en sangre mayores que aquellos que fueron asesinados siendo adictos.

Se ha encontrado evidencia experimental que comprueba que las señales asociadas a la droga juegan un papel fundamental en la tolerancia. En diversos experimentos con etanol y opiáceos, en modelos animales, se ha observado mayor tolerancia a determinados efectos de la droga ante estímulos asociados a la administración de la misma, no siendo así para los que han recibido dosis en presencia de estímulos no asociados a la droga (Siegel et al., 2000). En perros se encontró disminución del ritmo cardíaco al substituir la epinefrina, después de administraciones repetidas, por salina; y en ratas se administró una dosis letal, a un grupo se le realizaron administraciones repetidas de morfina asociadas a señales audiovisuales que estarían presentes en la prueba, mientras que a otro grupo se le hicieron las administraciones previas a la prueba sin asociarlas con otro estímulo, ambos grupos fueron evaluados ante las señales específicas de la prueba. Resultó que en el primer grupo la tolerancia al efecto analgésico de la morfina fue más pronunciada (Siegel & Ramos, 2002). Van Rijnsoever et al. (2004) realizaron un trabajo con ratones en el que encontraron tolerancia al efecto sedante en un grupo pretratado crónicamente y probado con D, el efecto fue similar al de un grupo pretratado y probado con salina, además se administró crónicamente salina a otro grupo y se probó con D, el efecto en este grupo fue una significativa disminución de la actividad motora.

Se ha encontrado evidencia de tolerancia en experimentos con humanos a los que se les ha administrado alcohol con diferentes señales asociadas a la bebida, en aquellos a los que se les presentaron señales no asociadas a la ingesta de alcohol se observó mayor efecto (Siegel, 1999), las señales como la barra de un bar, la compañía de compañeros habituales en la ingesta de alcohol e incluso la apariencia de la bebida son señales asociadas al efecto de la droga que permiten la aparición de tolerancia (Siegel et al., 2000); en el caso de la heroína se ha visto que estímulos relacionados con la administración de la droga, como el representar el ritual de administración e imágenes relacionadas con la droga, producen respuestas fisiológicas opuestas al efecto de la droga (Siegel, 1999).

### **3 ANSIEDAD**

La palabra ansiedad tiene su etimología en el latín “*anxietas*”, que significa congoja o aflicción. La ansiedad es un estado de malestar psicofísico que se caracteriza por una alteración que refleja turbación, inquietud o zozobra e inseguridad o temor ante lo que se experimenta como amenaza inminente, también se presentan síntomas respiratorios como falta de aire y ahogos. La ansiedad puede entenderse como incertidumbre o inseguridad, consiste en percibir la posible ocurrencia de algo que no se sabe qué es, que puede ser cualquier cosa (Cía, 2002).

Clínicamente la ansiedad se ha dividido en varias clases dependiendo del tipo de estímulo desencadenador (Leite-Silveira, Zangrossi, de Barros-Viana, Silveira & Guilherme-Graeff, 2001). El manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales en su 5ª versión (APA, 2013) clasifica los trastornos de ansiedad según el tipo de estímulos desencadenadores pero todos se caracterizan por una anomalía respecto al desarrollo y exceso de miedo (respuesta emocional ante una amenaza real o percibida como inminente) y ansiedad (anticipación a una amenaza futura), también se menciona en el manual que la alteración en la ansiedad tiene una alta comorbilidad con diferentes trastornos.

#### **3.1 Bases biológicas de la ansiedad**

Martin, Ressler, Binder y Nemeroff (2009) consideran que los desórdenes de ansiedad resultan en parte de una disrupción en la función de centros neuronales relacionados con las emociones. Al conjunto de tales estructuras de procesamiento emocional se le llama sistema límbico, que de acuerdo con Carpenter (1994) es un conjunto de estructuras cerebrales relacionadas con funciones viscerales y conductuales, entre las estructuras que lo comprenden están: la circunvolución subcallosa, del cuerpo calloso y del hipocampo (la circunvolución del hipocampo y la del cuerpo calloso tienen una relación de continuidad directa), así como los derivados corticales primitivos, la circunvolución del hipocampo y la circunvolución dentada.

Respecto a las estructuras del sistema límbico Martin et al. (2009) mencionan que en la corteza límbica se encuentran la corteza insular y la corteza cingulada que se encargan de procesar componentes sensoriales, afectivos y cognoscitivos del miedo; otra estructura límbica es el hipocampo que tiene control sobre el sistema de respuesta de estrés hipotalámica y participa en la reacción negativa del eje hipotalámico-pituitario-adrenal; la amígdala procesa los estímulos emocionales externos y da inicio a las respuestas apropiadas, es también responsable de la expresión del miedo y agresión y del comportamiento defensivo de algunas especies, además participa en la formación y recuperación de memorias relacionadas a estados emocionales y de miedo; también el núcleo central de la amígdala está fuertemente interconectado con estructuras corticales incluyendo la corteza límbica, y también recibe señales del hipocampo, tálamo e hipotálamo. Carpenter (1994) dice que este último se relaciona con la actividad visceral, endocrina, y metabólica, con la regulación de la temperatura, el sueño y la conducta emocional.

De acuerdo con Beck y Fibiger (1995) las estructuras cerebrales que se ven involucradas en la ansiedad y que forman sistemas neurales son: la corteza cingulada, núcleo accumbens, varios núcleos amigdalinos, núcleo paraventricular talámico, núcleo ventral lateral geniculado, los núcleos hipotalámicos ventromedial, lateral y dorsal, el área ventral tegmental, y el área supramamilar.

Se ha encontrado por medio de la medición de neurotransmisores que la variación de los estados afectivos genera cambios en el SNC, de hecho la simple exposición a algún estímulo aversivo genera cambios químicos en diversos sistemas neurotransmisores (Carvalho, Albrechet-Souza, Masson & Brandão, 2005). Los estímulos ansiolíticos y ansiogénicos pueden producir cambios en las áreas involucradas en la expresión de factores motivacionales, esto produce actividad neuronal que induce cambios en la liberación de neurotransmisores, por ende también influye en la inmunorreactividad de la proteína Fos (resultante de un proceso de transcripción de ADN en ARNm y su traducción a proteína) ya que la

expresión de esta se da como consecuencia de la activación neuronal (véase en el apartado 6), la proteína Fos aumenta o disminuye su expresión dependiendo del tipo de estímulo, sea este ansiogénico o ansiolítico (Fontanesi et al., 2007). Se han realizado diversos estudios en los que se han empleado diferentes formas para realizar lecturas de actividad neuronal relacionada con estados de ansiedad, como en el desorden de pánico, de ansiedad generalizada y de ansiedad social. Entre las diferentes estructuras implicadas en los estados de ansiedad se pueden mencionar algunas que presentan mayor actividad, la cual ha sido encontrada con estudios de neuroimagen y en la señalización neurotransmisora y neuroendocrina con diferentes neurotransmisores, las estructuras recurrentes son: la corteza cingulada, amígdala, tálamo, hipotálamo, hipocampo, núcleo rafe y putamen (Martin et al., 2009).

Los modelos animales en los que se estudian los efectos conductuales y neuronales de las drogas ansiolíticas proveen información útil para la comprensión de sus acciones en humanos; los efectos conductuales de las drogas ansiolíticas se describen como la desactivación del “sistema de inhibición del comportamiento” y las acciones neuronales más importantes que tienen en común las drogas ansiolíticas se relacionan con la desactivación del control de la “actividad theta” (ondas electromagnéticas que se detectan en el cerebro a través del encefalograma) en el sistema septo-hipocampal (SSH), los cambios en la función septo-hipocampal, especialmente en la actividad theta, pueden subyacer tanto a los cambios normales como patológicos en la ansiedad; el área septal es muy importante ya que tiene gran relevancia sobre la actividad theta y se ha visto que es afectada por drogas ansiolíticas, el área septal medial es de importancia por ser un punto clave en el circuito a través del cual las drogas ansiolíticas pueden alterar la función del hipocampo y por lo tanto la del SSH (McNaughton & Gray, 2000).

Se ha demostrado la participación de diferentes sistemas neuroquímicos en la modulación de la ansiedad. Según Martin et al. (2009), en los desórdenes de pánico y ansiedad se han visto implicados diferentes sistemas de mensajeros

neuroquímicos como las monoaminas: dopamina, norepinefrina y serotonina; neuropéptidos como: colecistoquinina (CCK), galanina, neuropéptido Y (NPY), vasopresina (AVP) y oxitocina; y los aminoácidos: GABA y glutamato. A continuación se describen algunos de los sistemas neuroquímicos mencionados.

Las catecolaminas norepinefrina (noradrenalina), epinefrina (adrenalina) y dopamina se forman por hidroxilación y descarboxilación del aminoácido esencial fenilalanina presente en la proteína L-fenilalanina, que por acción de la enzima fenilalanina hidroxilasa se transforma en tirosina, la tirosina se convierte en DOPA por la acción de la tirosina hidroxilasa, después DOPA se transforma dopamina en las vesículas de almacenamiento, a través de hidroxilación de dopamina se produce la norepinefrina, y la feniletanolamina N-metiltransferasa (se encuentra en altas concentraciones en la medula suprarrenal) es la enzima responsable de convertir la norepinefrina (actúa en receptores adrenérgicos ligados a proteínas G) en epinefrina; las neuronas productoras de dopamina se proyectan a partir de la sustancia negra hasta el núcleo caudado y el putamen (a través del sistema nigroestriado) y del área tegmental ventral al sistema límbico y la corteza (a través de las proyecciones mesolímbicas y mesocorticales); mientras que las neuronas que contienen norepinefrina en el sistema nervioso periférico (SNP) se localizan en los ganglios simpáticos y tienen proyecciones a todas las neuronas postganglionares simpáticas. Los cuerpos celulares de las neuronas de norepinefrina en el SNC se localizan en dos áreas: el locus coeruleus y los núcleos tegmentales laterales. Las proyecciones noradrenérgicas de estas células se ramifican de manera extensa y se distribuyen ampliamente; las proyecciones noradrenérgicas parecen representar un papel modulador en la activación cortical (Waxman, 2011).

La serotonina (5-hidroxitriptamina) es una importante amina reguladora en el SNC, se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. Tiene efectos vasoconstrictores y de aumento en la presión sanguínea. Las neuronas que contienen serotonina están presentes en los núcleos del rafe de la protuberancia anular y bulbo raquídeo;

estas células son parte de la formación reticular y tienen amplias proyecciones a la corteza y al hipocampo, ganglios basales, tálamo, cerebelo y médula espinal (Waxman, 2011). Se han realizado diversas investigaciones sobre los estados depresivos y de ansiedad, debido a esto ha sido posible la creación de diversos fármacos que permiten modular estos estados y la comprensión de la participación de la serotonina ha sido de suma importancia, en el uso de agentes antidepresivos se ha visto que participan como agonistas de la serotonina incrementando los niveles de este neurotransmisor, además de que los efectos ansiolíticos de la buspirona pueden deberse a las acciones agonistas de la serotonina (Stahl, 2013).

Los neuropéptidos son péptidos (aminoácidos) que son sintetizados por una neurona, se encuentran en el sistema nervioso central y periférico, también células no nerviosas pueden sintetizar algunos péptidos como la somatostatina que es sintetizada por las células “D” de los islotes de Langerhans y algunas células nerviosas que no pueden sintetizar péptidos pueden almacenarlos como pasa con la beta-endorfina en grupos de neuronas del sistema ventricular. Un péptido está compuesto por menos de 100 aminoácidos, un polipéptido se compone de 100 a 200 aminoácidos y una proteína consta de más de 200; la síntesis de los neuropéptidos se da de la siguiente forma: primero se da la transcripción en la que el ARN-mensajero (ARN-m) se sintetiza a partir del ADN, el ARN-m sale del núcleo y tiene lugar la traducción, el ARN-m es leído por los ribosomas que están asociados generalmente al retículo endoplásmico lo cual origina el pre-pro-péptido, éste es introducido en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso y mediante la acción de una endopeptidasa se elimina el péptido señal (pre) quedando sólo el pro-péptido inactivo (pro-péptido), dicho proceso en el que se elimina el “pre” también puede darse, de forma menos frecuente, en el aparato de Golgi, después en el retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi y/o vesículas que se originan a partir de éste, se elimina parte del precursor, la modificación química se da en las vesículas y/o el complejo de Golgi y consiste en la acetilación, ciclación y/o amidación de los neuropéptidos, quedando el péptido propiamente sintetizado; los neuropéptidos pueden actuar como neuromoduladores (acción paracrina y autocrina) en los

receptores presinápticos y postsinápticos lejanos, como neurotransmisores en los receptores postsinápticos próximos por medio de sinapsis química y como neurohormonas actuando sobre sitios lejanos del lugar de liberación como las fibras musculares (Medina-Medina, 2009).

Los aminoácidos GABA (efecto inhibitorio) y glutamato (efecto excitatorio) actúan a través de receptores ionotrópicos y metabotrópicos, en el primer caso las proteínas receptoras sobre la membrana postsináptica se unen a la sustancia transmisora y sufren un cambio conformacional inmediato que abre el canal iónico y genera el potencial postsináptico excitatorio (PPSE) breve o un potencial postsináptico inhibitorio (PPSI); en el segundo caso el mecanismo de acción es a través de un sistema de segundos mensajeros, habitualmente a través una proteína G, la cual tiene un período latente más prolongado y la duración de la respuesta puede durar varios minutos o más (Snell, 2007).

### **3.1.1 GABA**

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor de efecto inhibitorio distribuido ampliamente en el SNC (Cortes-Romero, Galindo, Galicia-Isasmendi y Flores, 2011; Gilalbert-Santos, Barahona-Gomariz y Rodríguez-Artalejo, 2005; Menéndez-Antolín, 2005). Su presencia es de 30-40% en las células nerviosas del cerebro, la presencia de este neurotransmisor garantiza el equilibrio entre excitación e inhibición, lo cual es requisito para la función sensitiva, cognitiva y motora, la alteración en la función GABAérgica subyace a diferentes trastornos como ansiedad depresión y drogadicción (Cortes-Romero et al., 2011). El GABA actúa de forma selectiva sobre los sitios de reconocimiento específicos de los receptores GABA (Medel-Matus et al. 2011).

La acción de este neurotransmisor se produce sobre los receptores de la membrana celular, pertenece al grupo de los aminoácidos, su precursor es el ácido glutámico y la enzima que es responsable de sintetizar a este último es la glutamato descarboxilasa, y la que se encarga de degradar al GABA es la GABA-transaminasa

(Gilalbert-Santos et al., 2005; Menéndez-Antolín, 2005). La sensibilidad y actividad de GABA es regulada por la afinidad de ciertos fármacos, como las BDZ, sobre sus sitios de unión y reconocimiento de las subunidades que lo conforman (Medel-Matus et al., 2011).

Existe una relación estrecha entre GABA y las BDZ, Valverde-Alfaro (2011) menciona que el tipo de receptor GABA-A es el receptor endógeno de las BDZ; el receptor GABA-A ha sido muy estudiado en el desarrollo de fármacos, muchos fármacos tienen un mecanismo de acción que se relaciona con los sitios de unión de las BDZ. La importancia del estudio de los mecanismos de acción de GABA consiste en el modo en que la activación de los receptores GABA participa en la regulación de desórdenes como trastornos de ansiedad, sueño, crisis de pánico, status epilépticos y desórdenes a nivel cognitivo, tal es la importancia que la mayoría de los tratamientos terapéuticos tienen como blanco algún tipo de receptor GABA (Medel-Matus et al., 2011).

### **3.1.2 Receptores GABA**

Existen dos tipos de receptores GABA, los ionotrópicos (GABA-A y GABA-C) que actúan a través canales iónicos dejando pasar iones de Cl aumentando los niveles de este en el interior de la célula, de este modo hiperpolariza a las células nerviosas (Medel-Matus et al., 2011). Y los receptores metabotrópicos (GABA-B) acoplados a la proteína G.

Los receptores GABA-A se encuentran en el SNC, principalmente en la corteza cerebral, cerebelo y áreas límbicas, las cuales están relacionadas con la expresión fisiológica del estrés y la ansiedad; y en el SNP (Ferrarese et al., 1993). Los receptores GABA-A interaccionan con diversos tipos de fármacos con propiedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, miorelajantes y sedantes (Cortes-Romero et al., 2011). Los receptores GABA-A son de respuesta rápida al abrir y cerrar canales iónicos que producen despolarizaciones (respuestas excitatorias) en

las que actúan canales de sodio y potasio, e hiperpolarizaciones (respuestas inhibitorias) en las que actúan canales de cloruro (Lorenzo et al., 2009).

Los receptores GABA están compuestos por seis subunidades polipeptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\rho$  las que a su vez presentan isoformas  $\alpha(1-6)$ ,  $\beta(1-4)$ ,  $\gamma(1-4)$ ,  $\delta 1$ ,  $\epsilon 1$  y  $\rho(1-3)$  (Valverde, 2011). Las isoformas más ampliamente distribuidas son:  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 2$ ; el receptor GABA-A tiene una estructura pentamérica, las isoformas que lo componen son 2 subunidades  $\alpha 1$ , dos  $\beta 2$  y una  $\gamma 2$  (Martin, Bowery & Dunn, 2009). Las BDZ actúan sobre los receptores GABA-A, específicamente en las isoformas  $\alpha$ , produciendo un aumento en la acción inhibitoria del neurotransmisor GABA (Lorenzo et al., 2009).

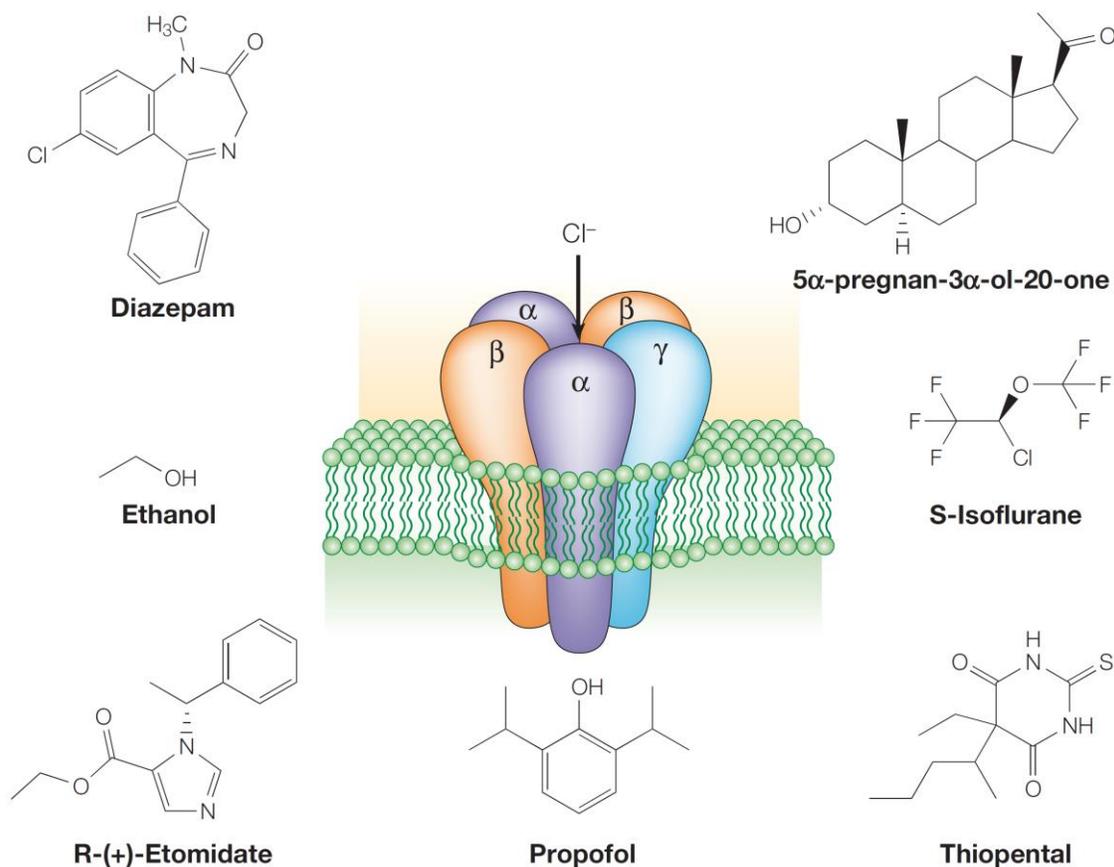


Figura 1. Estructura pentamérica del receptor GABA-A y estructura química de algunos ansiolíticos y anestésicos. Crédito: Belelli y Lambert (2005).

## **4 BENZODIAZEPINAS**

Las benzodiazepinas (BDZ) son muy eficaces en el tratamiento de la ansiedad tanto en casos crónicos como agudos, aunque existe preocupación por la posibilidad de abuso en el uso de este tipo de fármacos y de los efectos negativos que las BDZ tienen sobre la cognición y la memoria; además de los efectos ansiolíticos las BDZ poseen acciones sedantes, hipnóticas, anestésicas, relajantes, anticonvulsivas y relajantes musculares, aunque potencian el efecto sedante de otros componentes y afectan el control motor; a veces pueden presentarse reacciones paradójicas como aumento de la ansiedad, alcanzando crisis de pánico, otras reacciones patológicas pueden incluir irritabilidad, agresión o conducta desinhibida, y las dosis excesivas pueden ser letales si se combinan con otros depresores del SNC; el efecto de las BDZ es mediado por el complejo GABA-A, la función principal sobre este receptor es favorecer su actividad inhibitoria de los neurotransmisores GABA (Brunton, Chabner y Knollman, 2012).

Lorenzo et al. (2009) refieren que las BDZ son drogas muy utilizadas y principalmente el diazepam (D), que desde el principio de su utilización representó un éxito, aunque en la actualidad el empleo de estas sustancias se ha limitado por los hallazgos de desarrollo de dependencia y ciertos fenómenos en las poblaciones de riesgo o por el uso inadecuado, aun así, el rango de seguridad en el empleo de las BDZ se considera bastante amplio.

Alguacil-Merino y González-Martín (2005) mencionan que la tolerancia en BDZ y opioides puede deberse a diversos cambios moleculares que afectan a los procesos de metabolización del organismo ante una droga y al efecto que se ejerce sobre las células receptoras u otros mecanismos más complejos de homeostasis. Por ello es necesario tratar más el aspecto farmacológico de las benzodiazepinas.

### **4.1 Farmacología y benzodiazepinas**

Ruiz-Gayo y Fernández-Alfonso (2005) definen a la farmacología como una ciencia que se encarga del estudio de la acción y efecto de cualquier sustancia

química con la capacidad de provocar una alteración en el organismo; la acción se refiere al modo en que actúan los fármacos para modificar las funciones celulares, puede ser a través de sus dianas o receptores y los tipos de acción son: 1) específica/innespecífica, 2) inmediatas/diferidas, 3) agudas/prolongadas, 4) reversibles/irreversibles, 5) relacionadas con la dosis/no relacionadas con la dosis; y el efecto consiste en manifestaciones observables que son consecuencia de modificaciones funcionales del organismo como consecuencia de la administración de un fármaco.

## **4.2 Farmacodinamia y farmacocinética de las benzodiazepinas**

La farmacología posee una serie de subdivisiones, dos de ellas son la farmacodinamia y la farmacocinética. La farmacodinamia estudia la relación entre la concentración del fármaco en los sitios de acción y los efectos observados, y la farmacocinética estudia el ciclo intraorgánico: procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (Ruiz-Gayo y Fernández-Alfonso, 2005).

Farmacodinamia: Las BDZ actúan a través de canales iónicos (proteínas integrales de la membrana celular) mediante los que se permite el paso de solutos cargados eléctricamente, los mencionados canales fluctúan entre diversos estados conformacionales que se asocian al estado de activación de estos canales. Existen variados estímulos que afectan en diferente forma y grado a los canales iónicos como los activados por el potencial de membrana (“dependientes del voltaje”); por mensajeros extracelulares, el grupo de estos canales está integrado por receptores farmacológicos a los que se puede referir como “canales activados por ligando”; “activación por la interacción con mensajeros intracelulares”; y los activados por el estiramiento de la membrana (“canales mecano-sensibles”); los canales iónicos permiten el flujo de iones a altas velocidades, superiores a cualquier otra proteína transportadora y además son selectivos con los iones que los atraviesan; los receptores activados por ligando, sobre los que actúan las BDZ, se subdividen en familias, en una de ellas se encuentran los receptores GABA-A, los cuales son los principales efectores de la transmisión sináptica inhibitoria, es decir sobre los que

actúan las BDZ (Gilalbert-Santos et al., 2005). La tolerancia en este caso es de tipo funcional, se da cuando se reduce la reactividad de los sitios de acción de la droga (Pinel, 2007).

Farmacocinética: Las BDZ se absorben por completo por vía oral, a excepción del cloracepato, que se descarboxila con rapidez en el jugo gástrico, la absorción por vía intramuscular es errática; la distribución es amplia, en el líquido cefalorraquídeo la concentración es similar a la del fármaco libre en el plasma; las BDZ se metabolizan por medio de diversos sistemas enzimáticos en el hígado, formándose metabolitos activos, el metabolito activo de estas reacciones se une con ácido glucurónico y se elimina por la orina; las BDZ se clasifican de acuerdo a su vida media en dos tipos, acción prolongada y corta, en el primer caso el tiempo de vida media es mayor o igual a 12 h (alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clobazam, diazepam, flurazepam, flunitrazepam, halazepam, lorazepam, lorazepato, nitrazepam y quazepam), y en el segundo el tiempo de vida media es menor a 12 h (brotizolam, clonazepam, clorazepato, estazolam, midazolam, oxazepam, temazepam y triazolam); normalmente cuando se busca el efecto ansiolítico se recomiendan las BDZ de vida media prolongada, y las BDZ de vida media corta son más adecuadas para el efecto hipnótico (Fernández-García, González-Vina, y Pena-Machado, 2003). La tolerancia en este mecanismo es de tipo metabólico, la tolerancia se debe a que una menor cantidad de droga llega a los sitios de acción (Pinel, 2007).

## 5 MODELOS EXPERIMENTALES DE ANSIEDAD. EL LEC (LABERINTO ELEVADO EN CRUZ)

Los modelos animales experimentales tienen tres formas de validación, la primera es la “validación aparente” consiste en la similitud fenotípica del modelo en la que se manifiestan conductas que pueden ser idénticas a las respuestas fisiológicas observadas en humanos, pues en repertorio conductual no hay comparación con algún modelo animal partiendo del hecho de que el humano posee un lenguaje verbal complejo; la segunda es la “validación predictiva” que se refiere a la capacidad de los modelos de ser sensibles a los agentes farmacológicos clínicamente eficaces, mientras que los agentes que no tienen efecto en la clínica tampoco deberían tenerlo en los modelos experimentales; el tercero es el “criterio de la validez de constructo” que se refiere a la similitud entre los fundamentos teóricos que subyace en el modelo animal y el comportamiento humano, para lo cual se requiere que la etiología de los factores de comportamiento y biológicos que subyacen a la enfermedad pueda ser similar en los animales y los seres humanos (Bourin, Petit-Demoulière, Nic Dhonnchadha & Hascöet, 2007).

Existen diversos modelos experimentales de ansiedad, a continuación se presenta una clasificación, de modelos sensibles a las BDZ, hecha por Borsini, Podhorna y Marazziti (2002).

- *Modelos de conflicto*: en estos modelos la obtención de comida o agua es castigada por choques eléctricos de baja intensidad y las BDZ provocan que la tasa de respuestas castigadas aumente.
- *Batería de test defensivo en ratones*: las ratas son depredadores naturales de los ratones, así que cuando se pone a un ratón en presencia de una rata éste manifiesta una serie de conductas defensivas de riesgo, que al administrar BDZ tienden a disminuir.

- *Alimentación suprimida por la novedad*: Ratas en restricción de alimento son sometidas a estímulos novedosos y la conducta de alimentación es suprimida, sin embargo cuando se administra BDZ se contrarresta este efecto ante los estímulos novedosos.
- *Test de interacción social*: cuando se presentan dos ratas en un lugar iluminado y desconocido la interacción entre ellas es suprimida, al administrar BDZ bajo las condiciones mencionadas el efecto del estímulo luminoso y novedoso se contrarresta y el tiempo de interacción aumenta.

Bourin et al. (2007) hacen por su parte una clasificación de los modelos más efectivos y utilizados:

1) Modelos con procedimiento no condicionado.

- *Campo abierto*: esta prueba consiste en la colocación de un animal en un entorno desconocido, ceñido por paredes, en el que el suelo se divide en cuadrados, se tiene el propósito de observar la tendencia a permanecer en la periferia del campo sin entrar en el centro (tigmotaxia), los niveles de la defecación y la micción, el comportamiento de ansiedad en el campo abierto es provocada por dos factores: la prueba individual y la agorafobia, así en los niveles más altos de ansiedad se observa una disminución en el porcentaje de cuadrados visitados en el centro.
- *Laberinto elevado en Cruz*: es una de las pruebas de comportamiento más populares para la investigación sobre la ansiedad y es el más usado en modelos experimentales con ratas, debido a su utilidad también se han desarrollado diversas derivaciones; el LEC se ha utilizado ampliamente como una herramienta en la investigación de la base psicológica y neuroquímica de la ansiedad. Perfiles de comportamiento provocados en el LEC parecen incluir elementos de

la neofobia, la exploración y el conflicto de aproximación/evitación; Así, el aparato se refiere a menudo como un modelo de conflicto de comportamiento espontáneo incondicionado.

- *Paradigma luz oscuridad*: la prueba de exploración de luz/oscuridad es otro modelo para la ansiedad, esta prueba se basa en la aversión innata de los roedores a zonas iluminadas y en el comportamiento espontáneo exploratorio en respuesta a factores de estrés moderado, como un ambiente nuevo y la luz., en este modelo se permite a los ratones explorar libremente dos compartimentos interconectados que varían en tamaño, color e iluminación, los ratones de control colocados en la sección iluminada se moverá rápidamente en la zona oscura, cuando se administran BDZ este comportamiento se elimina y los sujetos pasan a la zona iluminada; de este modelo se han hecho varias adaptaciones.

## 2) Modelos con procedimiento condicionado.

- *Prueba de cuatro placas*: se basa en el castigo de un comportamiento innato, la exploración; el aparato está compuesto por cuatro placas metálicas de idéntico tamaño posicionadas en el suelo, así cuando el sujeto cruza de una a otra placa es castigado recibiendo pequeños choques eléctricos, se observa que cuando se administran BDZ aumenta el número de cruces castigados tolerados por el sujeto, pero claro se debe considerar si el fármaco posee efectos analgésicos y así estar seguros de que el comportamiento mostrado se deba a un efecto de ansiólisis y no de analgesia.
- *Sobresalto potenciado por el miedo*: este procedimiento implica dos pasos diferentes, primero los animales son entrenados para asociar un estímulo neutro (una luz), con un estímulo aversivo como una descarga eléctrica, después los animales son sometidos a un sonido

intenso, la respuesta de sobresalto a este estímulo incondicionado es potenciada por la presentación simultánea del estímulo luminoso previamente condicionado, los ansiolíticos producen una reducción de esta potencialización dependiente de la dosis.

- *Prueba de conflicto para lamer agua (o de Vogel)*: en esta prueba los sujetos (sedientos) lamen agua de un surtidor de agua, cada vez que las ratas dan una lamida reciben una descarga eléctrica de este modo la conducta cesa, después se administra un ansiolítico (se ha probado con DZ y pentobarbital) lo cual genera un efecto “anticonflicto” y el sujeto sometido a prueba soporta las descargas eléctricas para obtener agua.

Como ya se mencionó el LEC es el modelo experimental más difundido, este instrumento se compone de dos brazos abiertos y dos cerrados, las medidas que se toman son: frecuencia de entradas en brazos y tiempo de permanencia, por lo regular se hacen ensayos (exposición al LEC) de 5 min y en condiciones normales una rata manifiesta el comportamiento etológico llamado tigmotaxia, el cual es una tendencia a permanecer en contacto con superficies (paredes). Al administrar una droga ansiolítica como el D, el comportamiento se ve alterado pues se observa un aumento en el tiempo de permanencia y frecuencia de entradas en brazos abiertos (García, 2009).

Se sabe que diversos estímulos aversivos incrementan las respuestas de miedo, la aversión a dichos estímulos puede ser innata o aprendida, el LEC aprovecha el comportamiento aversivo natural que tienen las ratas hacia los espacios abiertos, se ha visto que las drogas tienen influencia sobre la relación entre estímulos y respuestas, el D administrado antes de una tarea en LEC, por ejemplo, causa mayor actividad y permanencia en los brazos abiertos (Carvalho et al., 2005).

La utilidad del LEC es tal que en la búsqueda de generar condiciones experimentales que sean más sensibles en la lectura del efecto de los fármacos que se utilizan, incluso se han hecho adaptaciones del LEC una de ellas es el laberinto elevado en T (LET), este modelo permite la medición de dos tipos de respuesta, evitación inhibitoria y escape (Leite-Silveira et al. 2001). Además este modelo resulta ser más sensible a los compuestos serotoninérgicos.

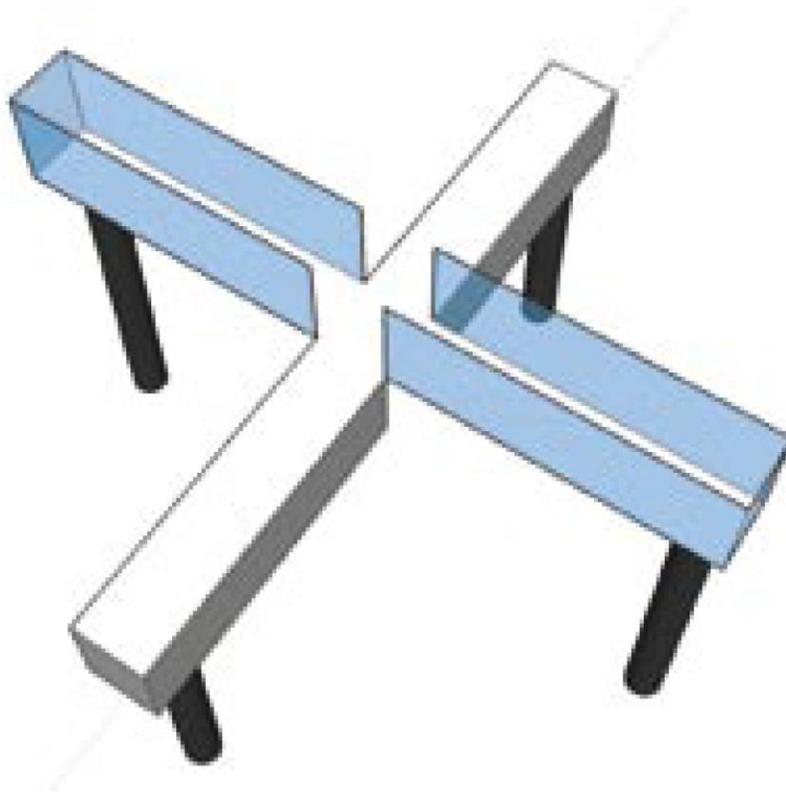


Figura 2. Laberinto elevado en cruz. Crédito: Patel, Seasholtz y Patel (2006).

## 6 EL PROTOONCOGEN C-FOS

La proteína Fos, producto del protooncogén (gen que promueve el crecimiento y división de la célula) c-Fos, es sintetizada en las neuronas como consecuencia del incremento de los niveles de calcio intracelular, AMP cíclico u otros segundos mensajeros; el incremento en la expresión de la proteína Fos ocurre como resultado de la activación neuronal, la cual puede ser causada por diversos estímulos: agentes convulsivos, corriente eléctrica, neurotransmisores, estrés por inmovilización, dolor, de tal modo su detección ha sido utilizada para el mapeo de cuerpos celulares activados por estímulos específicos (Leite-Silveira et al., 2001).

Existen cuatro cadenas de transducción de señal principales cuyo objetivo es hacer llegar una señal hasta los genes ubicados en el núcleo celular; los genes c-Fos y c-Jun son de respuesta rápida o “genes inmediato tempranos” (pertenecientes a una familia llamada “leucine zippers”), las proteínas resultantes de la expresión de dichos genes son Fos y Jun, al activarse un gen se transcribe en el ARN mensajero con ayuda de la enzima ARN polimerasa, el ARN mensajero es traducido entonces en su proteína correspondiente; dos de las principales cadenas de transducción de señal requieren la participación de un neurotransmisor como primer mensajero, la primera es un complejo de transducción de señal en el que participa la proteína G y diferentes enzimas, en la segunda existe la participación del calcio, ambas son parte de un proceso en el que en la primera cadena una enzima se encarga de fosforilar proteínas y en la segunda cadena otra enzima desfosforila a las fosfoproteínas; la tercer cadena de transducción implica la participación de hormonas, la señal llegada, por una hormona, a la célula va pasando de una hormona a otra hasta llegar al núcleo celular y activar el gen; de igual modo la cuarta cadena de transducción de señal tiene como propósito final llegar al genoma celular, pero en esta cadena participan las neurotrofinas y la señal se va pasando de una a otra enzima (diferente) del tipo quinasa (Stahl, 2013).

Clayton (2000) menciona que el proceso de transmisión del potencial de acción de las neuronas toma solo unos milisegundos y que existe un segundo

proceso que involucra la participación del un gen inmediato temprano, que puede durar minutos o hasta horas, por lo que es factible tomar medidas de la expresión de dicho gen tiempo después de haber sometido a los sujetos a alguna tarea de estrés. Se reporta que el gen inmediato temprano está involucrado en procesos de memoria y en otras condiciones como la ansiedad. Tal es el caso de la expresión del gen c-Fos, el cual es del tipo de genes de “factores de transcripción”, este tipo de genes codifican proteínas involucradas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis (Luque y Herráez, 2001).

Al presentarse un estímulo estresor se activarán estructuras encefálicas específicas que se encuentran relacionadas con el estrés, una forma de tomar medida de la actividad de tales estructuras es utilizando la expresión de c-Fos como marcador de actividad neural (Aronin, Sagar, Sharpo & Schwartz, 1990), ya que un estímulo de carácter emocional provocará la inmunorreactividad de Fos en áreas involucradas con estados emocionales (Fontanesi et al. 2007). Por tal motivo es conveniente utilizar la expresión de c-Fos como marcador de actividad neuronal relacionada con la ansiedad.

## **6.1 Inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica tiene sus antecedentes en la inmunofluorescencia, los primeros trabajos publicados datan de los 70's, por medio de esta técnica se pueden detectar componentes celulares y extracelulares (antígenos) por medio del uso de anticuerpos, de ahí “inmuno”, e “histoquímica” porque se utilizan sistemas de detección enzimáticos; la inmunohistoquímica representa un gran avance en el estudio de tejidos histológicos (García-Caballero, Gallego y Morel, 2012). El uso de la inmunohistoquímica, como en el caso de la detección de la proteína Fos, es empleada por la posibilidad de visualización de actividad neuronal desencadenada por la presentación de algún estímulo (Carvalho et al., 2005).

## 7 ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

### 7.1 Tolerancia a las BDZ

Ya se ha comprobado el efecto ansiolítico de las BDZ. Takahashi, Berton, Mormède y Chaouloff (2001) encontraron que al administrar D y realizar una prueba en LEC, ratas de la cepa SHR (spontaneously hypertensive rats) aumentan las entradas y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos con dosis de 0.75 y 1.5 mg/kg. En un trabajo con el laberinto asimétrico en el que sólo había un brazo sin ninguna pared Ruarte y Alvarez (1999) obtuvieron resultados que prueban que al administrar D se induce a un comportamiento opuesto a la conducta espontánea de la rata (permanecer en lugares cerrados) y esta busca explorar los lugares abiertos, no así en el caso de las ratas que no recibieron D.

En diversos trabajos se ha encontrado tolerancia de un ensayo, la cual consiste en el desarrollo de tolerancia a los efectos que genera un modelo experimental después de una exposición previa a él. Gonzalez y File (1997) evaluaron el efecto de la administración de midazolam (M) en dosis de 0.5 µg, 1µg y 5µg administradas directamente en el núcleo rafe dorsal en ratas con y sin exposición previa al LEC, todas las dosis mostraron efecto ansiolítico significativo, y para las ratas con un exposición previa al LEC antes del día del experimento sólo se mostró efecto ansiolítico significativo con dosis de 1µg, lo que muestra el efecto de tolerancia de un ensayo.

Carvalho et al. (2005) encontraron que se desarrolla tolerancia de un ensayo en un experimento con ratas administradas con M en dosis de 0.5mg/kg; en el experimento se expuso a los sujetos 5 min al LEC en dos fases, fase 1 y fase 2, y encontraron diferencias entre fases, en la segunda fase es en la que se administro el M y se encontró el efecto de tolerancia de un ensayo. Cruz-Morales, Santos y Brandão (2002) encontraron que en ratas administradas con midazolam en dosis de 1mg/kg se desarrolla tolerancia de un ensayo, dado que en un segundo ensayo en el LEC el miedo aumenta y los comportamientos sensibles a la ansiólisis se reducen.

Se han realizado diversos trabajos en los que se ha observado tolerancia crónica y asociativa. A continuación se hace mención de algunos.

Dunworth, Mead y Stephens (2000) reportaron que después de 20 administraciones de D se indujeron respuestas de abstinencia por medio de flumazenil, disminuyendo el umbral de convulsión y de dolor; la retirada se vuelve en sí misma un estímulo aversivo que altera el comportamiento de los sujetos experimentales, generando a la vez ansiedad en ellos, el cual es un estado opuesto al que provoca el D. La retirada de las BDZ después de una administración crónica da paso a exagerados niveles de ansiedad, Fontanesi et al. (2007) realizaron un estudio en el que analizaron las implicaciones neuronales subyacentes a la abstinencia en ratas, para ello interrumpieron de manera abrupta la administración de D encontrando mayor actividad neuronal en estructuras que participan en el mecanismo de defensa, lo cual implica que dichas estructuras se relacionan con la respuesta de abstinencia (véase en el apartado 7.2). Vlainic y Pericic (2009) encontraron en ratones que la administración crónica tanto de zolpidem como de D genera tolerancia, realizaron un experimento en el que descubrieron que el umbral de convulsión se reestabilizó después del tratamiento crónico. Se ha observado que con D, entre otras BDZ, se desarrolla tolerancia asociativa al contexto, ya que los efectos ansiolíticos son menores cuando la administración de una droga se realiza en presencia de señales ambientales específicas que se han asociado repetidamente la administración de la droga (Cedillo-Ildefonso et al., 2008).

## **7.2 Expresión del gen c-Fos**

En diversos experimentos se ha utilizado la expresión del gen c-Fos como forma de medición de actividad neuronal por la administración de ansiolíticos y/o exposición a estímulos ansiogénicos. A continuación se mencionan algunos trabajos.

Beck y Fibiger (1995) reportan, en un primer experimento, que ante la presencia de miedo condicionado (asociación entre estímulos ambientales y algún

evento aversivo), las ratas presentan gran actividad del gen c-Fos; en un segundo experimento se observó que el D reduce las conductas generadas por estímulos ambientales (de miedo) asociados a la administración de la droga, entre las estructuras en las que encontraron incremento de la expresión de c-Fos (por el miedo condicionado), están la corteza cingulada, piriforme, infralímbica y retrosplenial, el núcleo olfatorio anterior, los núcleos claustró y endopiriforme, núcleo accumbens, núcleo lateral septal, varios núcleos amigdalinos, núcleo paraventricular talámico, núcleo geniculado ventral lateral, los hipotalámicos ventromedial, lateral y dorsal, el área ventral tegmental, y el área supramamilar, los cuales se distribuyen en estructuras corticales y subcorticales.

Ryabinin et al. (1995) observaron un decremento de la expresión de c-Fos principalmente en la corteza cingulada y en el hipocampo después de administrar de forma aguda alcohol (de efecto ansiolítico) y haber sometido a los sujetos a un procedimiento de estrés por restricción de 15 min.

Thiele, Roitman y Bernstein (1998) observaron que después de 24 administraciones se desarrolla tolerancia al efecto ansiolítico del etanol, la expresión del gen c-Fos en hipotálamo y locus coeruleus mostró que la tolerancia se desarrolla al asociar el efecto a señales específicas y se revierte en un contexto no asociado al efecto de la droga.

Leite-Silveira et al. (2001) relacionaron la expresión de c-Fos con las respuestas de escape y evitación, realizaron un trabajo que consistió en tres ensayos en el LET para cada grupo (evitación inhibitoria, escape y control); se observó que en el grupo de evitación los sujetos incrementaron significativamente el tiempo de permanencia en el brazo cerrado al tiempo que se repetían los ensayos, lo que quiere decir aprendieron a evitar rápidamente los brazos abiertos; en cuanto al grupo de escape el tiempo de latencia para abandonar los brazos abiertos disminuyó significativamente pasados los tres ensayos, mejorando así la respuesta de escape; respecto a los datos neuronales se encontró que en la tarea

de evitación la expresión de c-Fos fue significativa en el núcleo medial de la amígdala, núcleo hipotalámico anterior y núcleo rafe medio, en contraste en la respuesta de escape se observó presencia significativa de Fos en el núcleo basolateral de la amígdala y en la materia gris periacueductal dorsal, además en ambas tareas se encontró expresión significativa de Fos en el núcleo paraventricular del tálamo y núcleo hipotalámico dorsomedial, viendo de este modo que se activan diferentes grupos de estructuras neuronales para la evitación y el escape, y por consiguiente se relacionan con la ansiedad.

Lamprea et al. (2002) reportaron que la estimulación eléctrica del colículo inferior evoca respuestas de alerta, congelamiento o escape dependiendo de la intensidad del estímulo, así también las estructuras en las que hubo mayor activación de Fos fueron diferentes, en la respuesta de congelamiento las estructuras con mayor presencia de Fos fueron el núcleo de la amígdala y la corteza entorrinal, en el umbral de la respuesta de escape las estructuras fueron el núcleo cuneiforme y la materia gris periacueductal dorsal del mesencefalo; las estructuras con activación de Fos en ambos comportamientos defensivos fueron la corteza frontal, hipocampo y núcleo basolateral de la amígdala. Vianna, Genaro, Ferreira-Netto, Eduardo y Lira (2003) reportan que la expresión de c-Fos se relaciona con respuestas como la de congelamiento y la de escape, mostrándose efectos en zonas corticales y subcorticales.

Fontanesi et al. (2007) encontraron que las estructuras implicadas en las respuestas a estímulos aversivos se relacionan con la abstinencia al D; utilizaron un grupo intacto, otros tres recibieron administraciones crónicas, el primero de sacarosa y el segundo de D, los cuales fueron expuestos al laberinto 30 min después de la última administración, al tercer grupo se le mantuvo en abstinencia durante 48 horas después de la última administración para después someterlo al LEC, y utilizando una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Newman observaron efecto ansiolítico en el grupo administrado con D en las entradas y permanencia en brazos abiertos, así como un efecto ansiogénico en el grupo con

abstinencia al D en el tiempo de permanencia en brazos abiertos; para los datos neuronales utilizaron dos grupos, sacarosa y D con abstinencia de 48 hrs, las estructuras analizadas fueron: la corteza prelímbica (CPrL), corteza cingulada 1 y 2 (Cg1 y Cg2), amígdala central (ACe), amígdala medial (AMe), amígdala basolateral (ABL), área hipocampal 1, 2 y 3 (Ca1, Ca2 y Ca3), núcleo accumbens (Acc), núcleo talámico paraventricular (PV), núcleo hipotalámico paraventricular (NPV), Núcleo hipotalámico anterior (NHA), hipotálamo lateral (HL), núcleo hipotalámico dorsomedial (NHDMD), gris periacueductal (GP), núcleo rafe dorsal (NRD), colículo superior (CS), colículo inferior (CI), locus cerúleos (LC), núcleo cuneiforme (NCun). En todas las estructuras (excepto LC) hubo tendencia a una mayor expresión de núcleos fos inmunorreactivos en el grupo con abstinencia de 48 hrs; en el telencéfalo sólo CPrL presentó diferencias significativas; en el diencéfalo: NHA, HL; y en el mesencéfalo: GP, NRD, CS, CI, LC y NCun, siendo el LC el único núcleo que mostró un decremento en vez de incremento.

Albrechet-Souza, Borelli, Carvalho y Brandão (2009) evaluaron si el M altera el comportamiento y la expresión de c-Fos en ratas en relación al test-retest en el LEC, se encontró que al administrar midazolam a ratas ingenuas el fármaco manifestó un efecto de ansiólisis que habitualmente se ha visto con este fármaco, pero para las ratas con experiencia en el LEC no se observó efecto ansiolítico, esto corresponde con lo encontrado en la medición de la expresión de c-Fos en Cg1.

Los anteriores trabajos muestran que la expresión de c-Fos se puede dar ante respuestas como el estrés, la ansiedad y el miedo. Respecto al desarrollo de tolerancia a una droga, puede ser entendido como una forma de aprendizaje que para su plena comprensión requiere considerar los mecanismos farmacológicos, conductuales, la participación de las señales ambientales, y la actividad neuronal. Existen motivos clínicos y sociales que alientan la necesidad de mayor comprensión de la tolerancia.

## **8 EXPERIMENTO**

### **8.1 Justificación**

La falta de una comprensión adecuada de los mecanismos de acción de una droga puede tener repercusiones fatídicas como la muerte, en el caso de usuarios de drogas adictivas dicho tipo de consecuencias se atribuye a la sobredosis, en muchos de los casos los sujetos habían consumido la dosis acostumbrada con la única diferencia de haberlo hecho en un ambiente diferente. Aunque existen muchos estudios sobre la tolerancia, hay pocos estudios sobre los mecanismos conductuales y neuronales de la tolerancia asociativa, particularmente en el caso de las BZD. El estudio de las BZD es importante ya que son el grupo de drogas más prescrito en el tratamiento de los diferentes desórdenes de ansiedad. Este estudio contribuye con información que tiene utilidad clínica en la comprensión de los efectos de las BZD en relación con la ansiedad y desarrollo de tolerancia, y además aporta información sobre los mecanismos neurales de la tolerancia farmacológica y asociativa.

### **8.2 Hipótesis**

En base en la revisión teórica se ha pensado que si se somete a los sujetos a una tarea de LEC, la actividad neuronal desencadenada por la exposición a los estímulos ambientales durante la tarea en LEC cambiará la expresión de c-Fos y, a la vez, dicha expresión puede variar por la administración de una droga, en este caso el D, dependiendo del tratamiento (administración aguda o crónica), del contexto en el que se administre dicha droga y si se presenta o no tolerancia.

### **8.3 Objetivo**

Estudiar la expresión de la proteína c-Fos en corteza prefrontal, cuerpo estriado, hipotálamo, complejo amigdalino, hipocampo y tallo, en ratas con administración aguda y crónica de D en diferentes contextos evaluados en el LEC.

Y analizar la relación de la expresión de c-Fos con la ejecución conductual en una tarea de LEC en ratas administradas de forma aguda y crónica con D.

## 8.4 Método

### 8.4.1 Metodología

*Sujetos:* Se emplearon ratas macho Wistar, experimentalmente ingenuas, de 250-270 gr de peso al inicio del experimento para los grupos de administración aguda y 160-180 gr para los grupos crónicos, provenientes del Bioterio general de la FES Iztacala-UNAM. Los sujetos (Ss) se alojaron en cajas de acrílico transparente y se asignaron aleatoriamente a grupos de 8 ratas cada uno, bajo un ciclo de luz/obscuridad 12:12, con libre acceso a agua y comida.

*Aparatos:*

- Laberinto elevado en cruz (LEC): El LEC está construido de PVC con dos brazos abiertos (50 x 10 cm), y dos brazos cerrados de la misma medida, elevado a 50 cm del piso, el nivel de iluminación fue de 50 lux. El diseño del laberinto se conforma de tal forma que los mismos tipos de brazos son opuestos a los otros.
- Cámara de vídeo grabación: Cámara (CCD, Modelo CA-156SEIA) está localizada 1 m arriba del cuadro central del laberinto, que permite una visión de los 4 brazos del laberinto. Los registros fueron grabados (Videograbadora WJ-2096) y analizados posteriormente con el Software Observer (Universidad de Sao Paulo, Brasil).
- Droga: Se administró intraperitonealmente (ip) D (Productos Roche Químicos e Farmacêuticos S. A.) diluido en solución salina (0.9%), en una dosis de 1 mg/kg.

#### 8.4.2 Procedimiento

El presente experimento se llevó a cabo en dos partes. En la primera parte se evaluaron los cambios de c-Fos ante la administración aguda de D, solución salina y exposición al LEC. Los Ss se asignaron al azar a cuatro grupos ( $n=8$ ), dos recibieron una administración aguda de salina (S) al 0.9% (1ml/kg, ip), uno en bioterio: agudo salina bioterio (ASB), y otro en laboratorio: agudo salina laboratorio (ASL); a los otros dos se les aplicó D (1.0 mg/kg, ip), uno en contexto bioterio: agudo diazepam bioterio (ADB), y otro en contexto laboratorio: agudo diazepam laboratorio (ADL). Posteriormente los grupos fueron evaluados por 5 min en el LEC, las administraciones se realizaron 30 min antes de la tarea en LEC. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto se regresó al bioterio. Dos horas después los Ss fueron sacrificados y perfundidos para seguir con el procedimiento de c-Fos.

En la segunda parte se diseñó un experimento para evaluar los cambios de c-Fos en la tolerancia asociativa y farmacológica. Para desarrollar tolerancia al D los Ss se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos ( $n=8$ ). Dos grupos fueron inyectados con S (1 ml/kg, ip) al 0.9% ip por 20 días (una vez por día), uno en el contexto bioterio: crónico salina bioterio (CSB), y otro en el contexto laboratorio: crónico salina laboratorio (CSL); los otros dos grupos recibieron de igual forma 20 administraciones de D (1.0 mg/kg, ip), uno en bioterio: crónico diazepam bioterio (CDB), y otro en laboratorio: crónico diazepam laboratorio (CDL). Los grupos administrados en laboratorio permanecieron 30 min en dicho contexto antes de regresar a su caja de alojamiento. Para la prueba de tolerancia, el día 21 los grupos CSB y CSL recibieron una administración de S (1ml/kg, ip), y los grupos CDB y CDL fueron administrados con D (1.0 mg/kg, ip), todas las administraciones fueron realizadas en el contexto laboratorio, se dejó pasar 30 min después de la administración y se sometió a los sujetos a la prueba de LEC por 5 min. Dos horas después se hizo la perfusión, la extracción del cerebro y se siguió el protocolo de c-Fos.

LEC: Se grabó la prueba para posteriormente analizar los siguientes parámetros conductuales: frecuencia del número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, el tiempo de permanencia en éstos y en el cuadro central para cada uno de los sujetos. El criterio en ambos casos fue que los sujetos tuvieran las 4 patas en el brazo; la duración de la sesión fue de cinco minutos. Estos datos se usan para calcular el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) de acuerdo a la siguiente fórmula:  $[(\text{No. Entradas a brazos abiertos} / (\text{No. abiertos} + \text{cerrados})) \times 100]$  y el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos (TBA):  $[(\text{tiempo en brazo abierto} / 300) \times 100]$ , así como el total de entradas (entradas en brazos abierto+entradas en brazos cerrados).

Contexto: El contexto se define como el complejo de estímulos que conforman un contexto (p. ej. un ruido, o un sonido y/o los estímulos que integran estos espacios físicos). En este estudio hubo dos contextos:

- Bioterio: Este espacio físico se integró de las jaulas donde se colocan a las ratas, 2 estantes, una mesa, una balanza con la que se pesó a los sujetos, con luz natural.
- Laboratorio: En este se situó el laberinto elevado en cruz, el equipo de videograbación, un generador de ruido blanco y la luz de 50 lux.

Perfusión: Previo al sacrificio se registró el peso del animal y se anestesió con pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso); ya en estado de anestesia profunda se colocó al animal en una charola, se hizo un corte en la pared abdominal de la rata, lateralmente a lo largo de ambos márgenes de los huesos de las costillas, y después se cortó el músculo del diafragma, se despejó el corazón y posteriormente se hizo un pequeño corte en la aurícula derecha y rápidamente a través del ápice del ventrículo izquierdo se colocó un catéter de perfusión manteniéndolo fijo. Con la ayuda de una bomba de perfusión y a una velocidad constante (30 ml/min), se hizo circular 250 ml de solución salina fisiológica (0.9%) fría, seguida por 120 ml de solución fijadora la cual consistió de paraformaldehído al 4% diluida en buffer de fosfatos con pH 7.4.

Manejo de los tejidos: Dos horas después de la tarea en LEC se desecó el encéfalo y se colocó en solución fijadora por 12 horas, posteriormente el tejido fue sometido al proceso de crio-protección que consistió en colocarlo en concentraciones de sacarosa crecientes del 10, 20 y 30%, cada una durante 24 horas. Posteriormente se realizaron cortes histológicos en secciones de 50  $\mu\text{m}$  con ayuda de un criostato (MICROM HM 505N) a una temperatura de  $-22^{\circ}\text{C}$  de las siguientes estructuras, de acuerdo a Paxinos y Watson (2005):

- Corteza prefrontal: corteza cingulada 1 y 2 (Cg1 y Cg2) (+1.44mm a +1.08 mm); corteza prelímbica (CPRL) y corteza infralímbica (CIL) (+3.00 mm).
- Cuerpo estriado: núcleo accumbens (Acc) (+2.76mm a +1.08mm); caudado putamen (CPu) (+2.28mm a +0.48mm).
- Hipotálamo: núcleo hipotalámico anterior (NHA), núcleo hipotalámico paraventricular (NHPV) (-1.92 mm); y núcleo hipotalámico dorsomedial (NHDMD) (-3.00 mm).
- Complejo amigdalino: amígdala medial posterodorsal (AMePD), amígdala medial posteroventral (AMePV), amígdala central (ACe) y amígdala lateral (ALa) (-2.40mm a -2.64 mm).
- Hipocampo: hipocampo áreas 1, 2 y 3 (Ca1, Ca2 y Ca3) (-2.64mm a -3.00 mm).
- Tallo: sustancia gris periacueductal dorsolateral (SGPDL), sustancia gris periacueductal dorsomedial (SGPDM) (-7.20mm a -7.56 mm); núcleo raquí dorsal (NRD), núcleo raquí lateral (NRL) y núcleo raquí ventral (NRV) (-7.80mm a -8.04 mm); Núcleo central del colículo inferior (NCCI) (-8.04mm a -8.40 mm); y Locus ceruleus (LC) (-9.60mm a -9.72 mm).

Inmuno-histoquímica (primera fase). Los cortes del encéfalo fueron sometidos a tres lavados de 10 minutos cada uno en buffer de fosfatos salino (PBS),

posteriormente fueron pasados por una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% durante 10 minutos, esto ayudó a eliminar la actividad endógena de las peroxidases; terminado este proceso se lavaron con PBS (tres lavados de 10 min, cada uno). A continuación se les adicionó suero normal de cabra al 30% (Vector Labs. Burlingame CA, EUA) en PBT (buffer de fosfatos con tritón al 0.3%) durante una hora. Finalmente se le agregó el anticuerpo primario para c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA EUA) diluido 1:2000 en suero normal de cabra disueltos en PBT al 0.3%, durante 72 horas en cámara húmeda refrigerada (4° C).

Inmuno-histoquímica (segunda fase). Posterior a la incubación con el primer anticuerpo, los cortes histológicos se sometieron a tres lavados con PBS (10 min cada uno); después se agregó el anticuerpo secundario biotilnado (anti conejo) hecho en cabra (Vector Labs. Burlingame CA, EUA) diluido 1:200 en PBT, durante una hora y después lavados en PBS (tres de 10 minutos cada uno). A continuación el tejido fue incubado en el complejo Avidina-Biotina HRP (1:250 Vector Labs Burlingame CA, EUA) por una hora. Concluido dicho proceso se realizaron tres lavados en PBS. Posteriormente la localización de la proteína Fos fue revelado con una solución 0.05% de diaminobencidina (Polyscience, Warrington, PA EUA) en presencia de sulfato de níquel (10 mg/ml Fisher Scientific, Pittsburg PA EUA) cloruro de cobalto (10 mg/ml Fisher Scientific Pittsburg PA EUA) y 0.01% de peróxido de hidrógeno, lo que produjo un precipitado púrpura-negruczo. Se continuó con tres lavados con PBS. Por último las laminillas fueron lavadas en agua destilada dos veces durante tres minutos, luego deshidratadas en alcoholes al 70%, 90% y finalmente en alcohol al 100%. Una vez que se secaron, las laminillas fueron montadas con Permount (Fisher Scientific) y observadas al microscopio.

Para el análisis histológico se utilizó un microscopio Olympus BX41 al cual se le adaptó una cámara a color con sistema de enfriamiento (Evolution VF de Media Cybernetics Bethesda MD). Y un software analizador de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics Bethesda MD) con el que se hizo un conteo automatizado del número de neuronas que resultaron inmunorreactivas a Fos.

### **8.4.3 Análisis de datos**

Los datos se analizaron por ANOVAS de una vía con el tratamiento como factor para la respuesta de ansiedad evaluada por el porcentaje de entradas y de permanencia en los brazos abiertos.

Se determinó la media y el error estándar de la expresión del gen c-Fos en cada uno de los tratamientos, se analizaron con una ANOVA de una vía y las comparaciones post hoc (Fisher LSD) se realizaron cuando  $p < 0.05$ .

## 9 RESULTADOS

Debido a que no se encontraron diferencias entre contextos en los grupos inyectados con salina, en los resultados conductuales y neuronales, se tomó la decisión de unirlos en un solo grupo para cada tratamiento: agudo y crónico. De este modo quedan ASB y ASL como AS, y los grupos CSB y CSL quedan como CS.

### 9.1 Conductuales

Se utilizó el número total de entradas como control de actividad motora y no se mostraron diferencias entre grupos. En la Figura 3 se puede observar que en el registro del porcentaje de EBA se observaron diferencias respecto al control independientemente del contexto en el tratamiento agudo y dependiendo del contexto para el tratamiento crónico. Se encontró que en el porcentaje de entradas a brazos abiertos en la prueba del LEC, los sujetos tratados de manera aguda con D (ADB y ADL) mostraron valores significativamente mayores ( $F=5.9141$ ,  $p=.00000$ ) respecto al control AS, haciendo evidente de ese modo el efecto ansiolítico del D. Al comparar CDB, grupo pretratado en un contexto diferente del de la prueba del LEC, contra CS se observaron resultados similares a los vistos en ADB y ADL, el número de entradas fue significativamente mayor; en el grupo CDL, que fue pretratado en el mismo contexto de la prueba de LEC, no se vieron diferencias respecto de CS.

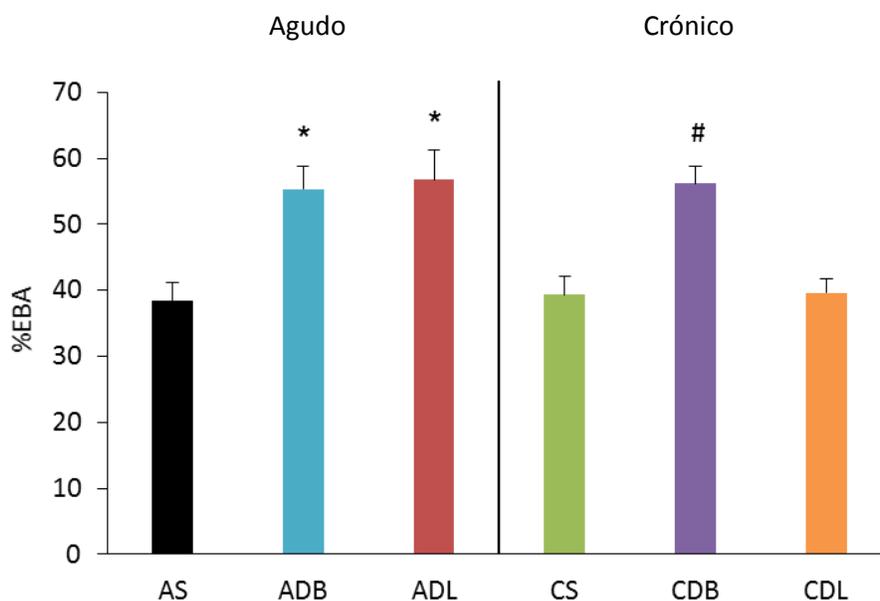


Figura 3. Media y  $\pm$ EEM de %EBA después de la administración aguda (A) o crónica (C) de diazepam (D) en los contextos laboratorio (L) y bioterio (B) (1mg/kg).  
\* $p < 0.05$  vs AS. # $p < 0.05$  vs CS.

En la figura 4 que en el porcentaje de TBA se encontraron efectos similares a los hallados en el porcentaje de EBA. Se observó que los valores arrojados por los grupos administrados de forma aguda con D en ambos contextos fueron significativamente mayores ( $F=5.9141$ ,  $p=.00000$ ) al compararlos contra el grupo AS, siendo de este modo evidente el efecto ansiolítico del D. En el grupo CDB, que fue el pretratado crónicamente en un contexto diferente del de la prueba del LEC, el tiempo de permanencia en los brazos abiertos fue significativamente mayor respecto de su control CS, comportándose así de forma similar a los grupos ASB y ASL, y por lo tanto también se observó el efecto ansiolítico del D. En cuanto a los valores arrojados por el CDL, grupo pretratado en el contexto de la prueba de LEC, no se evidenciaron efectos ansiolíticos, se encontró que el porcentaje de TBA fue similar a CS.

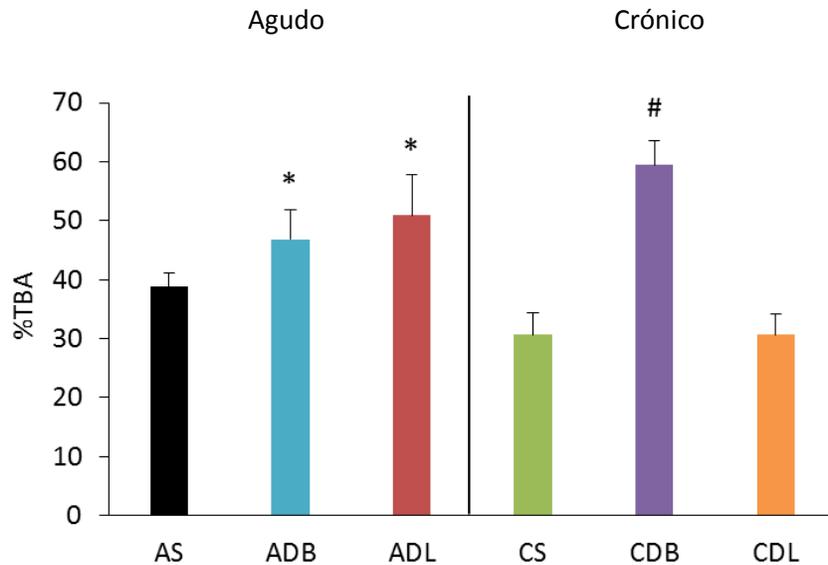


Figura 4. Media y  $\pm$ EEM de %TBA después de la administración aguda o crónica de D (1 mg/kg). \* $p < 0.05$  vs AS. # $p < 0.05$  vs CS. ♦ $p < 0.05$  vs CDL.

## 9.2 Inmunohistoquímica

Para cada grupo utilizado se realizó el análisis estadístico de la expresión de c-Fos en cada uno de las áreas incluidas en las regiones de corteza prefrontal, cuerpo estriado, hipotálamo, complejo amigdalino, hipocampo y tallo. Las comparaciones se hicieron por contexto para ambos tratamientos: agudo y crónico.

Los grupos ADB y ADL se compararon contra AS, se observa que en la mayoría de las estructuras la presencia de Fos es significativamente menor que en AS. En la parte del trabajo realizado con grupos de administración crónica los resultados encontrados fueron diferentes de lo encontrado en el tratamiento agudo. Los grupos CDB y CDL se compararon contra el control CS. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 1. Media ( $\pm$ E.E.M.) de neuronas inmunoreactivas en un área de $1 \mu\text{m}^2$ en núcleos de la corteza prefrontal de ratas con administración aguda o crónica de D, sometidas a una tarea de LEC. * $p < 0.05$ vs AS y # $p < 0.05$ vs CS.						
Estructuras	AS	ADB	ADL	CS	CDB	CDL
Cg1	230.08 $\pm$ 35.24	106.51 $\pm$ 10.02 *	135.12 $\pm$ 23.73 *	200.5 $\pm$ 9.41	166.61 $\pm$ 22.18	198.77 $\pm$ 30.38
Cg2	223.01 $\pm$ 39.30	67.79 $\pm$ 12.20 *	149.66 $\pm$ 15.42	193.82 $\pm$ 19.56	157.52 $\pm$ 27.42	194 $\pm$ 25.71
CPrL	182.56 $\pm$ 12.94	46.31 $\pm$ 3.62 *	105.21 $\pm$ 39.27 *	133.18 $\pm$ 13.99	143.12 $\pm$ 13.82	186.04 $\pm$ 14.68
CIL	249.81 $\pm$ 31.68	104.91 $\pm$ 39.24 *	112.36 $\pm$ 41.35 *	175.72 $\pm$ 12.91	147.49 $\pm$ 16.48	200.48 $\pm$ 28.27 #

En la tabla 1 se observa que en el área de corteza prefrontal hubo diferencias significativas en la media de la expresión de c-Fos en ADB y ADL al hacer las comparaciones contra el control en los núcleos Cg1 ( $F=6.5847$ ,  $p=0.017306$ ), Cg2 ( $F=9.3662$ ,  $p=0.006319$ ), CPrL ( $F=8.12868$ ,  $p=0.009624$ ) y CIL ( $F=4.69403$ ,  $p=0.040149$ ). Para el tratamiento crónico en el CPrL ( $F=3.9268$ ,  $p=0.059424$ ) el promedio de expresión de c-Fos en CDL fue significativamente mayor que en el control.

Tabla 2. Media ( $\pm$ E.E.M.) de neuronas inmunoreactivas en un área de $1 \mu\text{m}^2$ en núcleos del cuerpo estriado de ratas con administración aguda o crónica de D, sometidas a una tarea de LEC. * $p < 0.05$ vs AS.						
Estructuras	AS	ADB	ADL	CS	CDB	CDL
Acc	229.08 $\pm$ 11.05	134.71 $\pm$ 19.55 *	87.62 $\pm$ 24.02 *	195.39 $\pm$ 15.26	154.41 $\pm$ 8.02	247.28 $\pm$ 43.43
CPu	236.37 $\pm$ 14.66	140.31 $\pm$ 28.96 *	117.01 $\pm$ 33.84 *	187.64 $\pm$ 15.10	170.41 $\pm$ 11.33	222.89 $\pm$ 54.46

En la tabla 2 se encuentra que en el cuerpo estriado hubo diferencias en Acc ( $F=14.3905$ ,  $p=0.001572$ ) y CPu ( $F=5.4584$ ,  $p=0.028029$ ) para ADB y ADL respecto al control. En el tratamiento crónico no se encontraron diferencias significativas en la inmunorreactividad de c-Fos.

Tabla 3. Media ( $\pm$ E.E.M.) de neuronas inmunoreactivas en un área de $1 \mu\text{m}^2$ en núcleos del hipotálamo de ratas con administración aguda o crónica de D, sometidas a una tarea de LEC. * $p < 0.05$ vs AS.						
Estructuras	AS	ADB	ADL	CS	CDB	CDL
NHA	249.33 $\pm$ 35.48	104.48 $\pm$ 13.64 *	132.35 $\pm$ 17.35 *	195.58 $\pm$ 26.05	166.5 $\pm$ 7.74	208.42 $\pm$ 17.55
NHPV	241.58 $\pm$ 22.26	102.37 $\pm$ 20.58 *	124.04 $\pm$ 61.96 *	176.66 $\pm$ 12.84	168.45 $\pm$ 10.85	238.75 $\pm$ 56.99
NHDMD	323.58 $\pm$ 44.60	119.29 $\pm$ 25.49 *	133.39 $\pm$ 39.00 *	219.96 $\pm$ 3.55	184.08 $\pm$ 6.18	290.31 $\pm$ 60.37

La tabla 3 muestra que en el tratamiento agudo, tanto en ADB como ADL, se encontraron diferencias significativas en el área hipotalámica en la media de expresión de Fos en NHA ( $F=10.1472$ ,  $p=0.004938$ ), NHPV ( $F=3.53660$ ,  $p=0.073558$ ) y NHDMD ( $F=9.38498$ ,  $p=0.006281$ ). En el tratamiento crónico no se encontraron diferencias estadísticamente diferentes.

Estructuras	AS	ADB	ADL	CS	CDB	CDL
AMePD	241.52 $\pm$ 43.54	92.06 $\pm$ 26.16 *	96.02 $\pm$ 44.88 *	186.31 $\pm$ 9.43	158.91 $\pm$ 7.88	199.51 $\pm$ 47.02
AMePV	251.25 $\pm$ 14.23	142.80 $\pm$ 26.80 *	119.66 $\pm$ 36.46 *	190.19 $\pm$ 10.15	179.41 $\pm$ 17.36	210.93 $\pm$ 34.59
ACe	275.04 $\pm$ 25.54	80.18 $\pm$ 38.02 *	96.45 $\pm$ 38.67 *	200.79 $\pm$ 10.17	178.8 $\pm$ 2.71	218.77 $\pm$ 40.08
ALa	240.56 $\pm$ 35.88	113.85 $\pm$ 23.73 *	139.47 $\pm$ 38.01 *	179.75 $\pm$ 10.39	176.18 $\pm$ 7.38	191.12 $\pm$ 30.55

En la tabla 4 se ve que en el tratamiento agudo el complejo amigdalino presentó diferencias significativas en los grupos agudos respecto al control en AMePD ( $F=4.73549$ ,  $p=0.039345$ ), AMePV ( $F=6.5770$ ,  $p=0.017360$ ), ACe ( $F=9.75435$ ,  $p=0.005581$ ), y en ALa ( $F=4.08541$ ,  $p=0.054643$ ) sólo se encontraron diferencias significativas en ADB respecto al control, sin embargo ADL muestra una clara tendencia a una menor expresión de c-Fos. En el tratamiento crónico no se encontraron diferencias estadísticas significativas pero en ACe ( $F=0.7001$ ,  $p=0.521667$ ) se observó una tendencia clara a una menor expresión de c-Fos en CDB, y fue similar en CDL.

Estructuras	AS	ADB	ADL	CS	CDB	CDL
Ca1	221.20 $\pm$ 44.34	55.64 $\pm$ 21.12 *	102.33 $\pm$ 44.07 *	187.29 $\pm$ 18.74	156.25 $\pm$ 11.63	184.81 $\pm$ 24.43
Ca2	173.49 $\pm$ 10.67	51.18 $\pm$ 18.95 *	98.66 $\pm$ 27.98 *	217.37 $\pm$ 8.92	104.93 $\pm$ 10.64 #	133.95 $\pm$ 21.43 #
Ca3	173.36 $\pm$ 9.74	116.72 $\pm$ 21.67 *	98.22 $\pm$ 27.11 *	128.91 $\pm$ 7.47	127.43 $\pm$ 12.19	141.78 $\pm$ 13.22

La tabla 5 muestra que en el área hipocampal se vieron diferencias significativas en ADB y ADL respecto a su control en Ca1 ( $F=5.02006$ ,  $p=0.034322$ ),

Ca2 (F=9.07894, p=0.006943), y en Ca3 (F=3.5375, p=0.073523) sólo ADL fue significativamente diferente del control y ADB mostró una tendencia a menor expresión de c-Fos. En el tratamiento crónico se encontró que en Ca2 (F15.6626, p=0.001172) la inmunorreactividad de la proteína Fos fue significativamente menor tanto en CDB como en CDL.

Tabla 6. Media ( $\pm$ E.E.M.) de neuronas inmunireactivas en un área de $1 \mu\text{m}^2$ en núcleos del tallo de ratas con administración aguda o crónica de D, sometidas a una tarea de LEC. *p<0.05 vs AS y #p<0.05 vs CS.						
Estructuras	AS	ADB	ADL	CS	CDB	CDL
SGPDL	255.75 $\pm$ 44.47	121.25 $\pm$ 38.74 *	98.27 $\pm$ 18.57 *	263.54 $\pm$ 26.70	137.18 $\pm$ 13.04 #	225.18 $\pm$ 29.59
SGPDM	248.22 $\pm$ 25.82	87.56 $\pm$ 34.79 *	124.04 $\pm$ 27.46 *	189.5 $\pm$ 7.83	181.10 $\pm$ 12.76	216.31 $\pm$ 17.33
NRD	219.25 $\pm$ 39.84	98.41 $\pm$ 23.05 *	129.54 $\pm$ 37.93 *	184.02 $\pm$ 16.20	167.47 $\pm$ 12.98	185.18 $\pm$ 3.89
NRL	191.75 $\pm$ 23.84	77.62 $\pm$ 25.14 *	102.12 $\pm$ 32.95 *	174.31 $\pm$ 10.25	157.47 $\pm$ 16.53	195.06 $\pm$ 12.27
NRV	182.54 $\pm$ 9.31	113.54 $\pm$ 20.96	119.33 $\pm$ 38.14	176.33 $\pm$ 30.11	137.56 $\pm$ 13.19	140.12 $\pm$ 36.26
NCCI	221.14 $\pm$ 45.02	118.17 $\pm$ 21.90 *	128.14 $\pm$ 43.42	211.20 $\pm$ 24.17	177.65 $\pm$ 11.69	226.48 $\pm$ 32.06
LC	172.21 $\pm$ 29.31	71.62 $\pm$ 21.40 *	82.93 $\pm$ 25.42	120.83 $\pm$ 15.04	116.37 $\pm$ 20.42	192.63 $\pm$ 32.00

En la tabla 6 se puede observar que en el tallo se encontró que en SGPDL (F=5.67745, p=0.025414), SGPDM (F=8.08687, p=0.009768), NRL (F=4.73417, p=0.039370) y LC (F=4.63724, p=0.041285) ambos grupos agudos mostraron una expresión de c-Fos significativamente menor que el control; en NRD (3.31814, p=0.083270) sólo ADB difirió significativamente del control y ADL tendió a una menor expresión de c-Fos. En el tratamiento crónico en SGPDL (F=7.1565, p=0.013801) el grupo CDB tuvo una expresión de c-Fos significativamente menor que el control, mientras que el CDL sólo mostró una tendencia a una menor inmunorreactividad; y en las demás estructuras no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

## 10 DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio consistió en estudiar la expresión de la proteína c-Fos en corteza prefrontal, cuerpo estriado, hipotálamo, complejo amigdalino, hipocampo y tallo, en ratas con administración aguda y crónica de D en diferentes contextos evaluados en el LEC y su relación con la tolerancia. A continuación se discutirá sobre los resultados obtenidos en dos partes, primero se considerará la parte conductual y después la neuronal.

En los resultados obtenidos se encontró que la administración aguda de D evoca un efecto ansiolítico sobre el comportamiento de las ratas en una tarea en LEC independientemente de los estímulos contextuales en que se administre la droga. En este trabajo se consideraron dos contextos: bioterio y laboratorio, en éste último se realizaron los ensayos en LEC. Como se observó en los porcentajes de EBA y TBA, los grupos administrados con D muestran mayor actividad en los brazos abiertos del LEC, tanto en entradas como en tiempo, respecto al grupo AS cuyos porcentajes en EBA y TBA se utilizaron como línea base.

Diferentes trabajos realizados coinciden con lo encontrado en el presente experimento respecto al efecto ansiolítico del D en la tarea de LEC, Cedillo-Ildefonso et al. (2008) administraron D (1mg/kg) de forma aguda y los porcentajes de EBA y TBA fueron significativamente mayores al compararlos contra el grupo salina. También se observó algo similar con otra benzodiazepina, Albrechet-Souza et al. (2009) encontraron que con una sola administración de midazolam (0.5mg/kg) el porcentaje de EBA y TBA es significativamente mayor que en el grupo administrado con salina en una dosis similar. También Takahashi et al. (2001) encontraron que al administrar D en dosis de 0.75 y 1.5 aumenta el porcentaje de EBA y TBA en una tarea de LEC en ratas de la cepa SHR; y Ruarte y Alvarez (1999) realizaron un trabajo con el laberinto asimétrico, en el que sólo había un brazo sin ninguna pared, encontrando que al administrar D se induce a un comportamiento ansiolítico en las ratas y estas buscan explorar los lugares abiertos.

De acuerdo con Alguacil-Merino y González-Martín (2005) y San-Molina (2005), los organismos tienden naturalmente a un estado de homeostasis, por ello se esperaba que hubiese un cambio en el efecto ansiolítico de los sujetos por la administración repetida del D, lo cual efectivamente ocurrió. En el grupo CDL, que fue pretratado crónicamente en el mismo contexto en el que se realizó la prueba, se observó que la administración del fármaco perdió su capacidad inicial para generar el efecto ansiolítico, es decir que desarrolló tolerancia, este grupo mostró porcentajes similares a los del grupo control tanto en el porcentaje de EBA como en el de TBA. Resulta interesante que no se haya observado lo mismo en el grupo CDB, pretratado en un contexto distinto del de la prueba, en dicho grupo los porcentajes de EBA y TBA fueron significativamente mayores al ser comparados con CS, lo cual indica que la tolerancia al efecto ansiolítico está fuertemente relacionada con el contexto dado que el efecto ansiolítico del D se reestableció al cambiar las señales asociadas a la administración de la droga.

En un trabajo realizado por Vlainic y Pericic (2009) ya se ha dado prueba del desarrollo de tolerancia al D administrándolo de forma crónica, los autores realizaron un experimento en el que descubrieron que el umbral de convulsión provocada por el pentilenotetrazol había disminuido al administrar D pero se reestabilizó después del tratamiento crónico con D. Cedillo-Ildefonso et al. (2008) comprobaron el efecto agudo del D a una dosis de 1mg/kg y observaron tendencias claras que sugieren que después de repetidas dosis de D en presencia de estímulos ambientales específicos se observó un efecto de tolerancia y cuando la evaluación se realizó en un contexto diferente del de la prueba no se manifestó dicha tolerancia. Además se han realizado estudios sobre la abstinencia a las benzodiazepinas en el mismo laboratorio en que se llevó a cabo el presente trabajo de tesis, en los que se ha encontrado ansiogénesis ante estímulos ambientales asociados al efecto de la droga. De tal modo lo anterior es congruente con lo hallado en este trabajo sobre el efecto de tolerancia asociativa.

Por ello los estudios referidos y los hallazgos del presente trabajo refuerzan lo mencionado por Siegel (1999), Siegel et al. (2000) y Siegel y Ramos (2002) sobre que al asociar el efecto de la droga a un conjunto de señales específicas da como resultado la anulación o disminución del efecto de dicha droga, lo cual de acuerdo con los autores es debido a la participación de RCC. Aunque también las RCC de la administración de un fármaco pueden ser similares a los efectos de la droga, a este tipo de respuestas se le llama miméticas, el que una RC sea compensatoria o mimética del fármaco depende de su sitio de acción (Trujillo, 1994). Y ya sea una respuesta mimética o no mimética, la finalidad de ambos tipos de respuesta es preparar al organismo para recibir y procesar la sustancia que vaya a ingresar en él, así que tendría que considerarse la posible aparición de respuestas que semejen el efecto del D además de las que son opuestas.

En cuanto a la actividad neuronal se esperaba que en el presente trabajo lo encontrado en los resultados conductuales tuviera correspondencia con los datos de la expresión de c-Fos en la actividad neuronal. Aronin et al., (1990) han señalado que la activación de Fos se da de manera correspondiente a la presentación de un estímulo, en este caso si se presenta un estímulo ansiolítico, se activarían las estructuras neuronales relacionadas con la ansiedad.

Al analizar los resultados obtenidos se pudieron observar diferencias significativas que indican inhibición en la expresión de c-Fos independientemente del contexto en todos los núcleos de la corteza prefrontal de los grupos administrados de forma aguda, excepto en Cg2 de ADL donde la diferencia no fue significativa, pero aun así la diferencia respecto a AS fue de 155 menos células inmunorreactivas en promedio. Para la administración crónica se observó una adaptación de la expresión de c-Fos en los núcleos Cg1, Cg2, CPRL y CIL, la inhibición provocada por el efecto ansiolítico del D fue revertida por la administración crónica, incluso se encontró que en CIL la expresión de c-Fos fue significativamente mayor respecto a su control, con lo cual es posible observar tolerancia

farmacológica para ambos contextos como puede ser observado gráficamente en las micrografías de corteza prefrontal en el apéndice, página 79.

En el cuerpo estriado también se observa inhibición de la expresión de c-Fos en el tratamiento agudo, habiéndose encontrado diferencias significativas tanto en Acc como en CPu independientemente del contexto. Para el tratamiento crónico no se encontraron diferencias significativas, lo cual indica una recuperación en la expresión de c-Fos en Acc y CPu en ambos grupos con tratamiento crónico, y por consiguiente, desarrollo de tolerancia (micrografías de cuerpo estriado en página 83).

En el hipotálamo también se encontró que con la administración aguda de D se inhibe la expresión de c-Fos en NHA, NHPV y NHDMD independientemente del contexto. En el tratamiento crónico se observó también se da una recuperación en la expresión de c-Fos, por lo que se puede decir que se presentó tolerancia en ambos contextos (micrografías de hipotálamo en página 85).

Para el complejo amigdalino se consideraron cuatro núcleos AMePD, AMePV, ACe y ALa, en el tratamiento agudo se encontraron diferencias significativas en los cuatro núcleos respecto al control, lo cual corrobora el efecto inhibitorio que causa el D sobre la expresión de c-Fos. En el tratamiento crónico se observó que hubo recuperación de la expresión de c-Fos en las cuatro estructuras para ambos contextos, mostrándose así el desarrollo de tolerancia (micrografías de cuerpo amigdalino en página 88).

Para el tratamiento agudo se halló que en el hipocampo se inhibió la expresión de c-Fos en los núcleos del giro dentado Ca1, Ca2 y Ca3, en los que se mostró expresión de Fos significativamente menor que el control. En los grupos del tratamiento crónico los promedios fueron muy variantes, por lo cual puede inferirse que los núcleos del hipocampo responden diferencialmente al desarrollo de

tolerancia al efecto ansiolítico, sólo en Ca2 la expresión de c-Fos permaneció inhibida significativamente (micrografías de hipocampo en página 92).

En el tallo cerebral se tomaron en cuenta diferentes estructuras: sustancia gris periacueductal, núcleo rafe, colículo inferior y locus coeruleus; la sustancia gris mostró inhibición de la expresión de c-Fos en ambos grupos administrados de forma aguda; en el tratamiento crónico SGPDL reveló recuperación de la expresión de c-Fos en CDL, y en CDB permanece inhibida por el efecto del D; en SPDM se observó adaptación de la expresión de c-Fos ya que hubo recuperación en el promedio de células inmunorreactivas. En el rafe se puede observar que, en el tratamiento agudo, la expresión de c-Fos es inhibida significativamente en NRD y NRL; en el tratamiento crónico se desarrolla tolerancia ya que hay recuperación de la expresión de c-Fos. En el colículo inferior no hay datos estadísticos significantes que permitan hacer alguna aseveración, sin embargo sí se puede observar una tendencia a una menor expresión de Fos en el tratamiento agudo respecto al control, y para el tratamiento crónico se observa una recuperación en la expresión de c-Fos; esto puede deberse a que éste núcleo está más relacionado con la respuesta auditiva. En cuanto al locus coeruleus tampoco hay datos estadísticos que permitan determinar algo, aunque se observa una tendencia a la inhibición por el efecto del D (micrografías de tallo en página 95).

En resumen en los resultados del tratamiento agudo se observa que al comparar ADB y ADL contra el grupo AS la mayor parte de los núcleos neuronales mostraron inhibición de la expresión de c-Fos en los grupos administrados de forma aguda con D, sólo algunos núcleos del tallo y uno de la corteza prefrontal no mostraron diferencias significativas respecto a AS, de los cuales puede entenderse que la inhibición en las estructuras del tallo no está tan relacionada con la ansiedad, por ejemplo, los núcleos del rafe están más relacionados con el sueño y la vigilia, y el NCCI es un núcleo importante en las aferencias de información auditiva; teniendo en cuenta que el D genera efectos directamente sobre la ansiedad puede entenderse que NRV no haya mostrado inhibición significativa y que en NCCI sólo

haya sido significativa en ADB. En las demás estructuras analizadas para el tratamiento agudo se observó una inhibición significativa por lo que es correcto asumir que dicha disminución en la expresión de c-Fos se relaciona con el efecto ansiolítico del D. Con lo anterior se puede asegurar que hay una correspondencia entre conducta y respuesta biológica, el efecto ansiolítico observado en la tarea de LEC es congruente con la inhibición observada del gen c-Fos.

Lo observado en el tratamiento agudo refuerza lo hallado en estudios anteriores realizados con ansiolíticos (BDZ y alcohol) en los que se ha observado el efecto agudo y tolerancia relacionándolos con la activación del gen c-Fos. Beck y Fibiger (1995) reportan que ante la presencia de miedo condicionado, las ratas presentan gran actividad del gen c-Fos, pero el D reduce la expresión de Fos en diversas regiones cerebrales. Ryabinin et al. (1995) observaron un decremento evidente de la actividad del gen c-Fos principalmente en la corteza cingulada y en el hipocampo después de una administración de alcohol (de efecto ansiolítico) acompañada de un procedimiento de estrés por restricción. Albrechet-Souza et al. (2009) encontraron que la administración aguda de M disminuye la expresión del gen c-Fos en ratas en una tarea en el LEC.

La reducción de la expresión del gen c-Fos en los núcleos neuronales contemplados en el presente trabajo se puede explicar por la afinidad de las benzodiazepinas a los receptores GABA, ya Valverde-Alfaro (2011) ha mencionado que el receptor GABA-A es el receptor endógeno de las BDZ; Medel-Matus et al. (2011) por su parte refieren que las BDZ regulan la sensibilidad y actividad de GABA actuando sobre los sitios de unión y reconocimiento de las subunidades que lo conforman; y Cortes-Romero et al. (2011) coinciden con esto al argumentar que los receptores GABA-A interactúan con diversos tipos de fármacos con propiedades ansiolíticas, anticonvulsivantes, miorelajantes y sedantes. Y se ha visto que los receptores GABA-A se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC. Medel-Matus et al. (2011) hicieron una revisión de diversos trabajos donde reportan que los receptores GABA-A se han encontrado en el núcleo talámico reticular, circuito

tálamo-cortical, hipocampo, tálamo y giro dentado, y que las células GABAérgicas se encuentran también en médula espinal, cerebelo y ganglios basales. Sieghart y Sperk (2002) mencionan que las capas corticales, externas e internas, tienen una fuerte presencia de receptores GABA-A, que median los efectos del D, también hay presencia de receptores GABA-A en el hipocampo, en el cuerpo estriado y núcleo accumbens, en los núcleos reticular, geniculado ventrolateral, geniculado dorsolateral, medial y central, colículo inferior en los diferentes núcleos del hipotálamo, en los núcleos lateral, basolateral, medial y central de la amígdala, en cerebelo, y mesencéfalo en núcleos como el área tegmental ventral, núcleo rafé. Algunos de estos datos han sido confirmados por Young y Chu (1990) quienes reportan la presencia de receptores GABA-A en diversas estructuras neuronales en cerebros de ratas y humanos, de los que obtuvieron muestras de tejido neuronal y los examinaron después, encontrando que los receptores GABA-A están ampliamente distribuidos en la corteza cerebral, el hipocampo, ganglios basales, tálamo, cerebelo y en el tallo cerebral.

Respecto al tratamiento crónico, en general se observó una recuperación de la expresión de c-Fos en la mayoría de los núcleos, lo cual indica que hubo una adaptación de la inhibición de la expresión de c-Fos; en CDB los núcleos que mostraron recuperación en la respuesta de c-Fos fueron Cg1, Cg2, CPrL, CIL, Acc, CPu, NHA, NHPV, NHDMD, AMePD, AMePV, ACe, ALa, Ca1, Ca2, Ca3, SGPDL, SGPDM, NRD, NRL, NCCI y LC; en CDL los núcleos que revelaron recuperación en la inmunorreactividad de c-Fos fueron Cg1, CPrL, CIL, Acc, CPu, NHA, NHPV, NHDMD, AMePD, AMePV, ACe, ALa, Ca1, Ca3, SGPDL, SGPDM, NRD y NRL. Lo hallado en los grupos administrados de forma crónica da muestra de que ocurre una adaptación a la inhibición de la expresión de c-Fos, por lo que apoyándose en la evidencia estadística puede asegurarse que tras administraciones repetidas de D se desarrolla tolerancia farmacológica. Además de lo anterior se pudo observar también que aunque no hay evidencia estadística que permita asegurarlo, en el grupo CDB los promedios de los núcleos considerados para este estudio tendieron a una menor expresión de c-Fos que en el grupo CDL.

Lo que se encontró en el tratamiento crónico refuerza lo encontrado por otros autores. Thiele et al. (1998) hallaron desarrollo de tolerancia al efecto ansiolítico, en hipotálamo y locus coeruleus, utilizando etanol, tomaron lecturas del índice de expresión del gen c-Fos y observaron que la administración repetida ante señales específicas se relaciona con la tolerancia y que la expresión de c-Fos es mayor en el contexto asociado a la droga que en el contexto no asociado.

Hay otros estudios y trabajos previos del laboratorio en que se realizó éste estudio que refuerzan lo encontrado respecto a la adaptación de la actividad neuronal que contrarresta la inhibición de las BDZ. Fontanesi et al. (2007) efectuaron un estudio en el que analizaron las implicaciones neuronales subyacentes la abstinencia en ratas, para ello interrumpieron de manera abrupta la administración de D encontrando mayor actividad neuronal en diversas estructuras, y reportaron que la retirada de las BDZ, después de la administración crónica, da paso a exagerados niveles de ansiedad. Otro modo de estudiar la abstinencia es utilizando un antagonista como lo hicieron Dunworth et al. (2000), quienes reportaron que después de administrar D de forma crónica, se indujo por medio de flumazenil un estado de síndrome retirada que desencadenó respuestas de abstinencia. Y en el laboratorio donde se realizó la presente tesis ya se han realizado trabajos de esa naturaleza en el mismo laboratorio que se realizó este estudio, los cuales coinciden con que al exponer a los sujetos a los estímulos asociados a la administración de la droga sin que esta se administre se puede observar de forma marcada el efecto del síndrome de abstinencia, así como al administrar el D acompañado de un antagonista como el flumazenil ante los estímulos ambientales habituales en la administración de la droga.

Se esperaba que en el grupo CDB hubiese inhibición significativa. El hecho de que no se hayan observado diferencias significativas entre CDB y CS puede haberse debido a diferentes razones. Parece ser que no son muy específicos los estímulos que pueden desencadenar expresión de c-Fos. Fontanesi et al. (2007)

indican que diversos estímulos ansiolíticos y ansiogénicos pueden producir cambios en áreas involucradas en la expresión de factores motivacionales ya que la activación producida por un estímulo induce cambios en la liberación de neurotransmisores y por ende también influye en la inmunorreactividad de Fos. La expresión de c-Fos puede ser causada también por estímulos apetitivos además de los aversivos, siendo que los núcleos cerebrales implicados en la respuesta emotiva no sólo se relacionan con estímulos aversivos, por ejemplo, Robertson et al. (1991) reportan activación de c-Fos por la interacción sexual en el núcleo accumbens; y Romeo, Parfitt, Richardson y Sisk (1998) encontraron que al exponer a hámsteres machos a las feromonas de la hembra la inmunorreactividad de Fos aumentaba en la comisura hipocámpal y el complejo amigdalino.

Por lo anterior puede pensarse que el contacto con cualquier otro estímulo, además del contexto del LEC, podría haber influido sobre la expresión de c-Fos encubriendo el efecto ansiolítico del D al cambiar de contexto por los estímulos que pudieran presentarse en el trayecto. Sería muy útil tener mayor control sobre los estímulos contextuales, por ejemplo, se podría aislar a los sujetos totalmente del contacto con el exterior al ser trasladados utilizando acrílico negro para las cajas en las que sean llevados de tal modo que se eliminen todos los estímulos visuales del trayecto que pueden ser inespecíficos; si en el contexto laboratorio se tiene una iluminación de 50 lux se puede poner a los sujetos administrados en bioterio en un sitio privado totalmente de luz (para esto también servirían las cajas de acrílico negro); o tal vez sea viable emplear una luz intermitente en el contexto bioterio, Betancourt-Mainhard et al. (2008) hicieron esto con una fotoestimuladora alógena. De tal modo podría hacerse que la diferencia entre contextos sea más clara y que los estímulos contextuales tengan mayor saliencia, que según Castellucci y Kandel (1976) y Wyers, Peeke y Herz (1973) en un elemento muy importante en el desarrollo de habituación, y por lo tanto del aprendizaje. Tomando en cuenta que la tolerancia es una forma de aprendizaje asociativo es importante considerarlo.

Otro aspecto a tomar en cuenta que tal vez haya ejercido un efecto sobre los resultados es la vía de administración. Tengamos en cuenta que la tolerancia se desarrolla al asociar el efecto de la droga con estímulos específicos, y según Siegel (1999), los estímulos asociados pueden pertenecer también al ritual de aplicación de la droga (intra-administración), como es el caso de los adictos a la heroína en los que los objetos que usan para la aplicación, como la aguja, son capaces de evocar respuestas compensatorias. En dicho caso habría que considerar que aun cambiando el contexto de aplicación algunos estímulos permanecen presentes, en el caso de este estudio realizado con D sería prudente pensar que aunque se haya cambiado de contexto al grupo CDB, para la aplicación de D, la administración ip podría ser un estímulo asociado al efecto de la droga y por lo tanto favorecer la presencia de la tolerancia, lo cual no dejaría ver por completo el efecto de haber cambiado los estímulos asociados la droga, puesto que los estímulos intra-administración (como la inyección ip) pueden actuar en conjunto con los estímulos ambientales como estímulo condicionado. Un ejemplo puede ser el trabajo de Fontanesi et al. (2007) que optaron por una vía de administración oral porque anteriormente había visto un efecto ansiogénico en la tarea de LEC producido por la administración vía ip; administrando D vía oral comprobaron que se presentan los efectos ansiolíticos y síndrome de retirada en una tarea de LEC. Entonces, si la aplicación ip es capaz de evocar una respuesta ansiogénica, podría pensarse en la posibilidad de que pueda funcionar como un estímulo asociable al efecto de una droga, por lo cual podría optarse por la administración vía oral.

También habría que tomar en cuenta que el hecho de que no haya diferencias significativas puede deberse a los grandes márgenes de error, lo cual se podría solucionar robusteciendo la muestra, con ello se reduciría el error estándar y las diferencias serían más claras. Sin embargo se han realizado experimentos en el mismo laboratorio en el que se elaboró el presente trabajo encontrándose, que con una dosis de M de 1mg/kg, los índices de la expresión de la proteína Fos en núcleos de la corteza prefrontal dan muestra del efecto del contexto correspondiendo con los porcentajes de la prueba de LEC de manera más clara que con el D. Además,

en trabajos previos se ha encontrado evidencia conductual de que con el M se observan efectos de tolerancia asociativa más claros que con el D, Cedillo-Ildefonso (2008) reportó que al administrar de forma crónica M y D en dosis de 1mg/kg no se encontraron diferencias entre salina, M y D en una tarea de LEC, pero cuando el contexto de la prueba fue diferente del asociado a la administración de la droga se observó que con M sí se encontraron diferencias significativas respecto a salina, al contrario del D que no mostró diferencias significativas respecto a salina.

El siguiente paso en este trabajo consiste en comparar lo encontrado en el D con una BDZ de efecto ultracorto en condiciones similares (el midazolam), de este modo se podrá tener también información sobre las implicaciones de la acción prolongada del fármaco. Posteriormente se estará en condiciones de diseñar un nuevo estudio que permita mejorar la precisión de los hallazgos de este trabajo, a la vez que considerar el papel que juega la vida media en el desarrollo de tolerancia a los efectos ansiolíticos de las BDZ.

## 11 CONCLUSIÓN

La administración aguda de D evoca efectos ansiolíticos independientemente del contexto, lo cual se relaciona de forma positiva con la expresión del gen c-Fos. La administración de D causa cambios en la actividad neuronal y conductual que se relacionan positivamente. Con la administración aguda se da un efecto ansiolítico sobre el comportamiento independientemente del contexto.

La inmunorreactividad de la proteína Fos se relaciona positivamente con el efecto ansiolítico, en la actividad neuronal la expresión del gen c-Fos es inhibida con la administración aguda de forma clara en núcleos que participan en las funciones emocionales, y en aquellos núcleos que no se relacionan de forma directa con las funciones emocionales la expresión de c-Fos sólo tiende a ser menor. En la administración crónica. Esto refuerza la postura de que existe una relación entre el aspecto conductual y biológico.

Si se administra de forma repetida el D se desarrolla tolerancia al efecto ansiolítico ante estímulos asociados a la administración de la droga, pero cuando el contexto al que se ha asociado el efecto del D es cambiado hay una recuperación en la ansiolisis, esto indica que la tolerancia al efecto ansiolítico es de tipo asociativo y está fuertemente relacionada con el contexto.

En la expresión de c-Fos la inhibición causada por el D es revertida por la administración crónica de la droga en los núcleos implicados en las funciones emocionales independientemente del contexto, y al cambiar las señales asociadas al efecto de la droga ocurre una tendencia a una menor expresión de c-Fos, lo que sugiere que la inmunorreactividad de Fos es mayor ante señales asociadas al efecto de la droga y por lo tanto se alude a una correspondencia con lo observado en la tolerancia asociativa al efecto ansiolítico.

Se puede hablar de tolerancia farmacológica respecto a lo encontrado en la desinhibición de la expresión de c-Fos en ambos contextos. Y se puede sugerir la

participación del aprendizaje asociativo respecto a que la desinhibición tiende a ser mayor en el contexto asociado a las señales asociadas al efecto de la droga. Y posiblemente se puedan encontrar resultados más determinantes en condiciones de mayor control sobre la saliencia de estímulos.

## 12 REFERENCIAS

- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de neurología*, 32(4), 373-381
- Agudelo, R., y Guerrero, J. (1973). El sistema psicológico de B. F. Skinner. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 5 (2), 191-216.
- Albrechet-Souza, L., Borelli, K. G., Carvalho, M. C., & Brandão, M. L. (2009). The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. *Neuroscience*, 164, 387–397.
- Alguacil-Merino, L., y González-Martín, C. (2005). Tolerancia y procesos de adaptación. En M. Fernández-Alfonso y M. Ruiz-Gallo. *Fundamentos de farmacología básica y clínica* (pp. 257-264). Madrid, España: Editorial Centro de Estudios Ramón Areces, SA.
- Aronin, N., Sagar, S., Sharpo, F., & Schwartz, W. (1990). Light regulates expression of a Fos-related protein in rat. *Neurobiology*, 87(August), 5959-5962.
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fifth edition. Washington, DC: Author.
- Beck, C., & Fibiger, H. (1995). Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-fos: with and without diazepam pretreatment. *The Journal of Neuroscience*, 15(1), 709-720.
- Belelli, D., & Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: Endogenous Regulators of the GABAA Receptor. *Nature Publishing Group*, 16, 565-575.
- Betancourt-Mainhard, R (2002). *Condicionamiento clásico y drogas: Modulación de los procedimientos de extinción a la tolerancia y síntomas de abstinencia al etanol en ratas* (Tesis Doctoral). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Sociales, Chile.
- Betancourt-Mainhard, R., Inostroza-Parodi, M., y Laborda-Rojas, M. A. (2008). Modulación contextual de la tolerancia asociativa al etanol. *Revista latinoamericana de psicología*, 40(2), 243-257.
- Borsini, F., Podhorna, J., & Marazziti, D. (2002). Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology*, 163, 121–141.
- Bourin, M., Petit-Demoulière, B., Nic Dhonnchadha, B., & Hascöet, M. (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 21, 567–574.
- Brunton, L., Chabner, B., y Knollman, B. (2012). Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica (12ª Ed.). México DF: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Carpenter, M. (1994). Fundamentos de Neuroanatomía (4a Ed.). Montevideo, Uruguay: Editorial Médica Panamericana.

- Carvalho, M., Albrechet-Souza, L., Masson, S., & Brandão, M. (2005). Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(12), 1857-1866.
- Cedillo-Ildefonso, B. (2008). *Efecto del contexto en el desarrollo de la tolerancia y tolerancia cruzada a los efectos ansiolíticos del diazepam y midazolam* (Tesis Doctoral). UNAM, FES Iztacala, México.
- Cedillo-Ildefonso, B., Arriaga, J., y Cruz-Morales, S. (2008). Efectos del contexto en la tolerancia cruzada diazepam-etanol en el laberinto elevado en cruz (LEC). *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 34(1), 111-129.
- Cía, A. (2002). *La ansiedad y sus trastornos*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Polemos.
- Clayton, D. (2000). The genomic action potential. *Neurobiology of Learning and Memory*, 74, 185-216.
- Collett, B. J. (1998). Opioid tolerance: the clinical perspective. *British Journal of Anaesthesia*. 81, 58-68.
- Cortes-Romero, C., Galindo, F., Galicia-Isasmendi, S., y Flores, A. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revista de Neurología*, 52(11), 665-675.
- Cruz-Morales, S. E., Santos, N. R., & Brandão, M. L., (2002). One-trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(4), 973-978.
- Díaz-Dosque, C. G., y Quezada-Scholz, V. (2003). *CONDICIONAMIENTO CLÁSICO Y DROGAS Competencia de Claves: Interacción entre Estímulos Interoceptivos y Exteroceptivos* (Tesis de Licenciatura). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Sociales, Chile.
- Domjan, M (2010). *Principios de aprendizaje y conducta* (6a Ed.). México: Cengage Learning Editores.
- Dunworth, S. J., Mead, A. N., & Stephens, D. N. (2000). Previous experience of withdrawal from chronic diazepam ameliorates the aversiveness of precipitated withdrawal and reduces withdrawal-induced c-Fos expression in nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 12, 1501-1508.
- Ellis-Ormrod, J. (2005). *Aprendizaje humano* (4a Ed.). Madrid, España: Pearson Educación, S.A.
- Fernández-García, A., González-Vina, A., y Pena-Machado, Ma. Á (2003). Bases científicas para el uso de las benzodiazepinas. *Revista cubana de medicina general integral*. 19(1), pp. 0-0.
- Ferrarese, C., Appollonio, I., Bianchi, G., Frigo, M., Marzorati, C., Pecora, N., . . . Frattola, L. (1993). Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor: A possible link between stress, anxiety and the immune system. *Psychoneuroendocrinology*, 18(1), 3-22.
- Fontanesi, L. B., Ferreira, R., Cabral, A., Castilho, V. M., Brandão, M. L., & Nobre, M. J. (2007). Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Research*, 1116(29), 35-46.

- García, A. (2009). Efectos de la inyección intrahipocampal de escopolamina sobre el comportamiento en el laberinto en cruz elevado. *Suma Psicológica*, 16(1), 19-29.
- García-Caballero, T., Gallego, R., y Morel, G. (2012). Técnicas inmunohistoquímicas. En I. Martín-Lacave, y T. García-Caballero, *Atlas de inmunohistoquímica* (pp. 3-80). España: Ediciones Díaz de Santos.
- Gilalbert-Santos, J., Barahona-Gomariz, M., y Rodríguez-Artalejo, A. (2005). Receptores de clase 1: canales iónicos. En M. Fernandez-Alfonso y M. Ruiz-Gallo, *Fundamentos de farmacología básica y clínica* (pp. 19-35). Madrid, España: Editorial centro de estudios Ramón Areces, SA.
- Gonzalez, L., & File, S. (1997). A five minute experience in the Elevated Plus-Maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 4(17), 1505–1511.
- Grissom, N., & Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: Get used to it. *Neurobiology of Learning and Memory*. 92, 215-224.
- Hall, J. E. (2011). Organización del sistema nervioso, funciones básicas de la sinapsis y neurotransmisores. En A. C. Guyton (Ed.), *Tratado de fisiología médica* (12ª Ed.). Barcelona, España: Elsevier España, S.L.
- Hilgard, E. R., y Bower, G. T. (1973) Teorías del aprendizaje. México: Trillas.
- Kissin, I., Brown, P., Robinson, A., & Bradley, E. (1991). Acute tolerance in morphine analgesia: continuous infusion and single injection in rats. *Anesthesiology*, 74(1), 166-171.
- Laborda, M. A. (2009). Modelos animales en psicopatología experimental: miedo, tolerancia a las drogas y condicionamiento. *Revista de Psicología*, XVIII(2), 81-104.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Vianna, D. M., Castilho, V. M., Cruz-Morales, S. E. & Brandao, M. L. (2002). The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research*, 950, 186-194
- Leite-Silveira, MA., Zangrossi Jr, H., de Barros-Viana, M., Silveira, R., & Guilherme-Graeff, F. (2001). Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*. 126, 13–21.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasiain, I., Leza, J., Moro, M., y Portolés, A. (2009). Velázquez Farmacología básica y clínica. China: Editorial Médica Panamericana.
- Luque, J., y Herráez, Á. (2001). Biología molecular e ingeniería genética: Conceptos técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Barcelona, España: Gráficas Muriel.
- Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatric Clinics of North America*, 32(3), 549–575.

- Martin, I. L., Bowery, N. G., & Dunn, S. M. J. (2009). GABA Receptors. *Tocris Bioscience Scientific Review Series*, 32, 1-16.
- McNaughton, N., & Gray J. A. (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *Journal of Affective Disorders*, 61, 161-176.
- Medel-Matus, J. S., Cortijo-Palacios, L. X., Gasca-Pérez, E., Susan-Tepetlan, P. V., Pérez-Palacios, A., y Ramos-Morales, F. R. (2011). Receptor GABA<sub>A</sub>: implicaciones farmacológicas a nivel central. *Archivos de Neurociencias*, 16(1), 40-45.
- Medina-Medina, LE (2009). *Distribución de neuropéptidos en el diencefalo de la alpaca (lama pacos): estudio inmunocitoquímico* (Tesis doctoral). Recuperado de [http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/76282/1/DBCP\\_Medina\\_Medina\\_LE\\_Distribucion\\_de\\_neuropeptidos.pdf](http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/76282/1/DBCP_Medina_Medina_LE_Distribucion_de_neuropeptidos.pdf)
- Menéndez-Antolín, L. (2005). Enzimas como diana de fármacos. En M. Fernández Alfonso y M. Ruiz Gallo, *Fundamentos de farmacología básica y clínica* (pp. 97-110). Madrid, España: Editorial Centro de Estudios Ramón Areces S. A.
- Moscoso, M. S. (1984). El condicionamiento operante en biorretroalimentación. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 16(1), 61-76.
- Pavlov, I. (1927). *Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford, England: Oxford University Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The Rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- Patel, P. D., Seasholtz, A. F., & Patel, P. D. (2006). Computer-assisted scoring of the elevated plus maze. *BioTechniques*, 41(6), 700-704.
- Petrinovich, M (1973). A Species-Meaningful Analysis of Habituation. En H. V. S. Peeke, *Habituation* (pp. 1-57). USA: Academic Press.
- Pietrzykowski, A. Z. & Treistman, S. N. (2008). The molecular basis of tolerance. *Alcohol Research & Health*, 31(4), 298-309.
- Pinel, J. P. J. (2007). *Biopsicología*, (6ta Ed). Madrid, España: Pearson Educación, S. A.
- Quiroga-Romero, E. (1995). De Darwin a Skinner: Génesis histórica de la psicología del aprendizaje y del condicionamiento operante. *Psicothema*, 7(3), 543-556.
- Robertson, G. S., Pfaus, J. G., Atkinson, L. J., Matsumura, H., Phillips, A. G., & Fibiger, H. C. (1991). Sexual behavior Increases c-fos expression in the forebrain of the male rat. *Brain Research*, 564, 352-357.

- Romeo, R. D., Parfitt, D. B., Richardson, H. N., & Sisk, C. L. (1998). Pheromones Elicit Equivalent Levels of Fos-Immunoreactivity in Prepubertal and Adult Male Syrian Hamsters. *Hormones and Behavior*, 34(1), 48-55.
- Ruarte, M. B., & Alvarez, E. O. (1999). Behavioral profiles displayed by rats in an elevated asymmetric plus-maze: effects of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 99-106.
- Ruiz-Gayo, M., y Fernández-Alfonso, M. (2005). Introducción a la farmacología. Conceptos generales. En M. Fernández-Alfonso y M. Ruiz-Gayo, *Fundamentos de farmacología básica y clínica* (pp. 1-8). Madrid, España: Editorial universitaria Ramón Areces.
- Ryabinin, A., Melia, K., Cole, M., Bloom, F., & Wilson, M. (1995). Alcohol selectively attenuates stress-induced c-fos expression in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 15(1), 721-730.
- Sahún, I., Gallego, X., Gratacòs, M., Murtra, P., Trullàs, R., Maldonado, R., . . . Dierssen, M. (2007). Differential responses to anxiogenic drugs in a mouse model of panic disorder as revealed by Fos immunocytochemistry in specific areas of the fear circuitry. *Amino Acids*, 33, 677-688.
- San-Molina, L. (2005). Evolución de la dependencia de heroína y su asistencia en España. *Adicciones*, 17(2), 9-40.
- Siegel, S. (1999). Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archivald Lecture. *Addiction*, 94(8), 1113-1124.
- Siegel, S., Baptista, M., Kim, J., McDonald, R., & Weise-Kelly, L. (2000). Pavlovian psychopharmacology: The associative basis of tolerance. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 8(3), 276-293.
- Siegel, S., & Ramos, B., (2002). Applying laboratory research: Drug anticipation and the treatment of drug addiction. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 10(3), 162-183.
- Sieghart, W., & Sperk, G. (2002). Subunit Composition, Distribution and Function of GABA<sub>A</sub> Receptor Subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 795-816.
- Snell, R. S. (2007). Neuroanatomía clínica (6ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana S. A.
- Sokolov, Y. (1982). Percepción y reflejo condicionado. México DF: Editorial Trillas.
- Stahl, S. M. (2013). Stahl's Essential Psychopharmacology (4ª ed.). New York, USA: Cambridge University Press.
- Takahashi, R. N., Berton, O., Mormède, P., & Chaouloff, F. (2001). Strain-dependent effects of diazepam and the 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist SB 206553 in spontaneously hypertensive and Lewis rats tested in the elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 675-682.
- Thiele, T. E., Roitman, M. F., & Bernstein, I. L. (1998). Learned tolerance to ethanol-induced c-Fos expression in rats. *Behavioral Neuroscience*, 112(1), 193-198.

- Thompson, R. F. (2009). Habituation: A history. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92, 127-134.
- Trujillo, H. M. (1994). Tolerancia a las drogas y condicionamiento clásico. *Psicología conductual*, 2 (1), 43-69.
- Valverde-Alfaro, E. (2011). Receptores GABA. *Revista Cúpula*, 24 (1-2), 8-16.
- Van Rijnsoever, C., Taüber, M., Choulli, M., Keist, R., Rudolph, U., Mohler, H., . . . Crestani, F. (2004). Requirement of  $\alpha 5$ -GABA-A receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *The Journal of Neuroscience*, 24(30), 6785-6790.
- Vargas-Mendoza, J. E. (2006) Condicionamiento clásico pavloviano: apuntes para un seminario. México: Asociación Oaxaqueña de Psicología A.C.
- Vianna, D., Genaro, K., Ferreira-Netto, C., Eduardo, C., & Lira, M., (2003). Fos-like immunoreactive neurons following electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray at freezing and escape thresholds. *Brain Research*, 62, 179-189.
- Vlainic, J., & Pericic, D., (2009). Effects of acute and repeated zolpidem treatment on pentylentetrazole-induced seizure threshold and on locomotor activity: Comparison with diazepam. *Neuropharmacology*, March, 1-7.
- Walters, J., y Roth, R. (1982). Sedantes-hipnóticos y ansiolíticos. En J. R. Pinto (Ed.), *Fundamentos de farmacología*. Introducción a los principios de acción de los fármacos (2ª ed.). México DF: Harla.
- Waxman, S. G. (2011). Neuroanatomía clínica (1ª ed). México: McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V.
- Young, A. B. & Chu, D. (1990). Distribution of GABA, and GABA, Receptors in Mammalian Brain: Potential Targets for Drug Development. *Drug Development Research*, 21, 161-167.

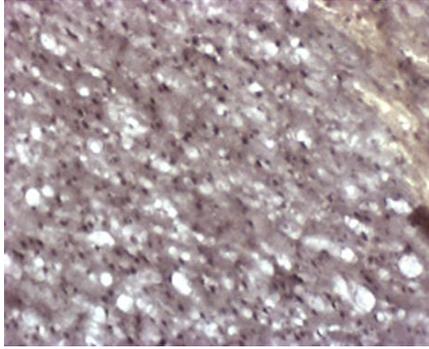
## APÉNDICE

En esta sección se presentan las micrograffías presentadas en una escala de  $1 \mu\text{m}^2$  de los tejidos neuronales en corteza cingulada áreas 1 y 2 (Cg1 y Cg2), corteza prelímbica (CPrL), corteza infralímbica (CIL), núcleo accumbens (Acc), caudado putamen (CPu), núcleo hipotalámico anterior (NHA), núcleo hipotalámico paraventricular (NHPV), núcleo hipotalámico dorsomedial (NHDMD), amígdala medial posterodorsal (AMePD), amígdala medial posteroventral (AMePV), amígdala central (ACe), amígdala lateral (ALa), hipocampo áreas 1, 2 y 3 (Ca1, Ca2 y Ca3), sustancia gris periacueductal dorsolateral (SGPDL), sustancia gris periacueductal dorsomedial (SGPDM), núcleo rafé dorsal (NRD), núcleo rafé lateral (NRL), núcleo rafé ventral (NRV), núcleo central del colículo inferior (NCCI) y Locus ceruleus (LC), de ratas sometidas a diferentes tratamientos y probadas en el LEC: administración aguda de salina en ambos contextos (AS), administración crónica de salina en ambos contextos (CS), administración aguda de diazepam en contexto bioterio (ADB), administración aguda de diazepam en contexto laboratorio (ADL), administración crónica de diazepam en contexto bioterio (CDB) y administración crónica de diazepam en contexto laboratorio (CDL). Los puntos negros representan las células inmunorreactivas donde hay expresión del gen c-Fos. A mayor número de puntos corresponde una mayor inmunorreactividad y por lo tanto mayor actividad neuronal.

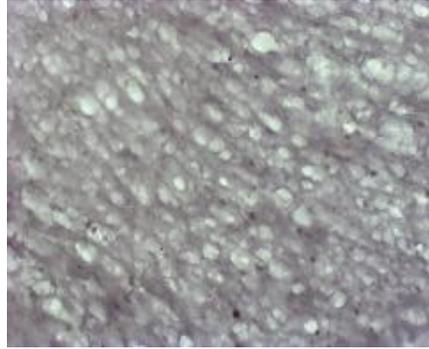
## Corteza prefrontal

### Cg1

Micrografías de Cg1 a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



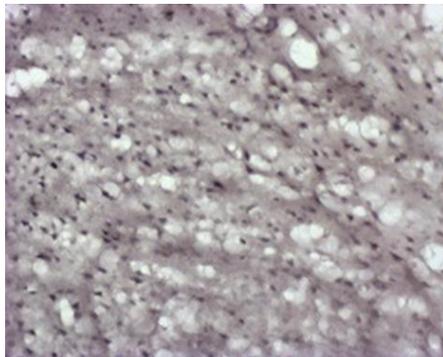
AS



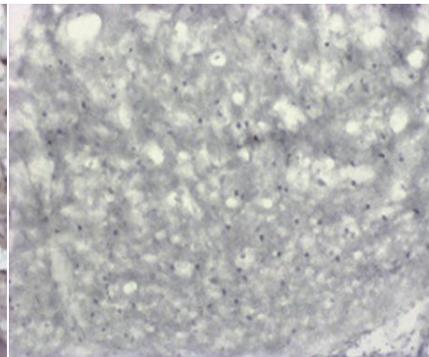
ADB



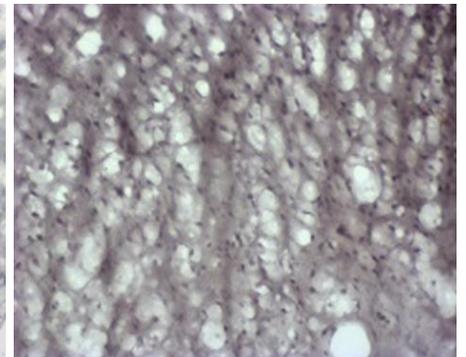
ADL



CS



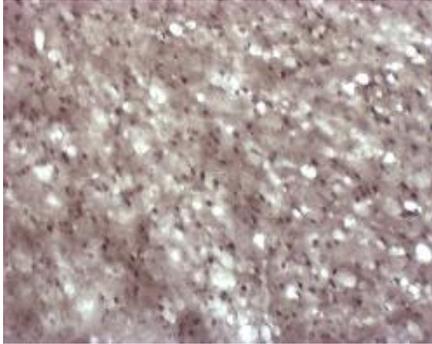
CDB



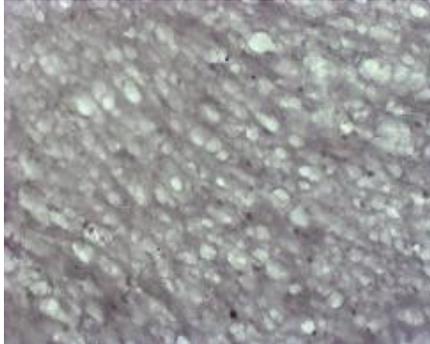
CDL

## Cg2

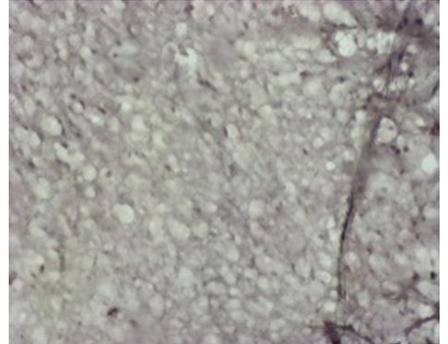
Micrografías de Cg2 a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



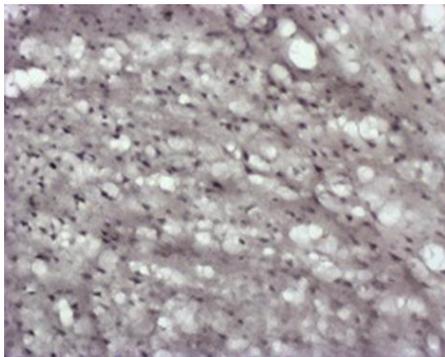
AS



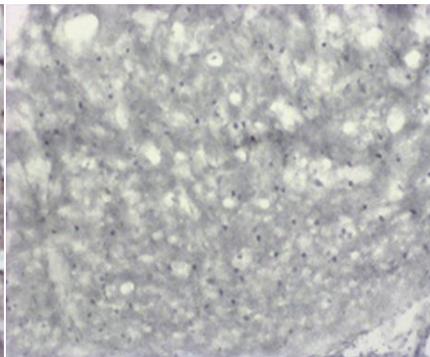
ADB



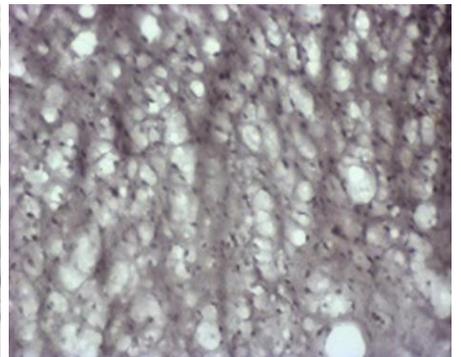
ADL



CS



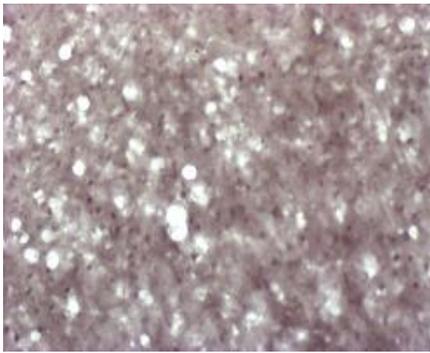
CDB



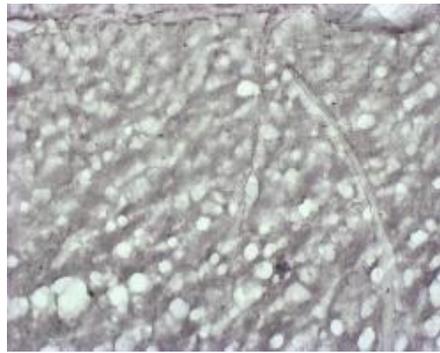
CDL

## CPrL

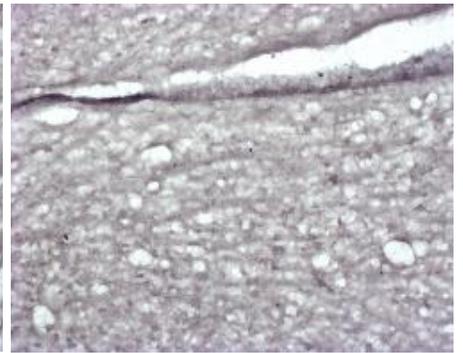
Micrografías de CPrL a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



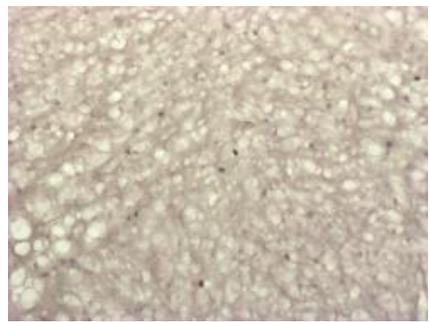
AS



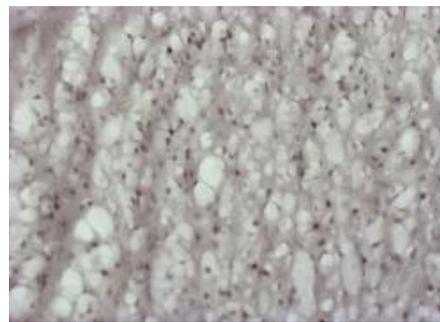
ADB



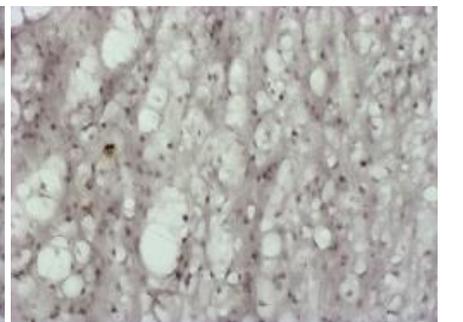
ADL



CS



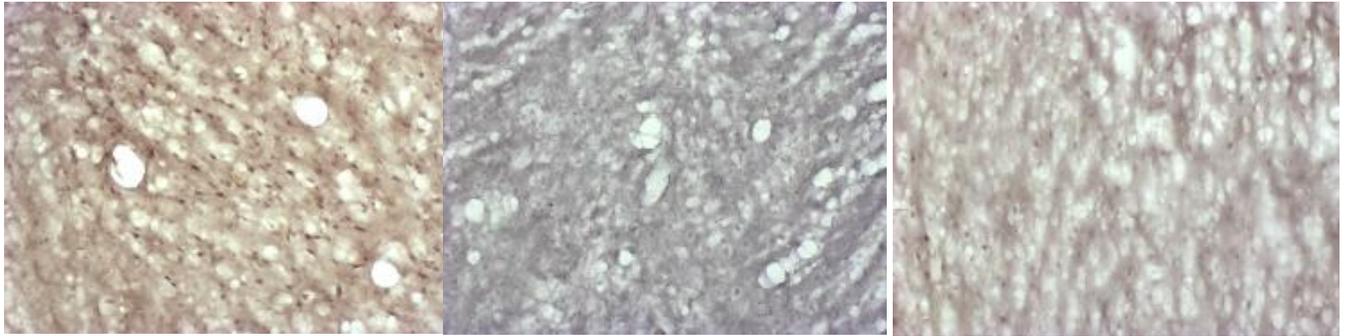
CDB



CDL

## CIL

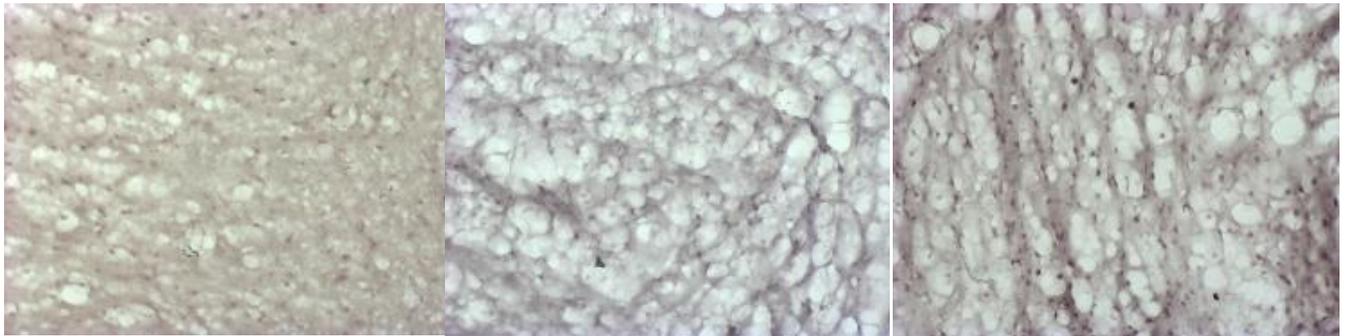
Micrografías de CIL a una escala de 1  $\mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS

ADB

ADL



CS

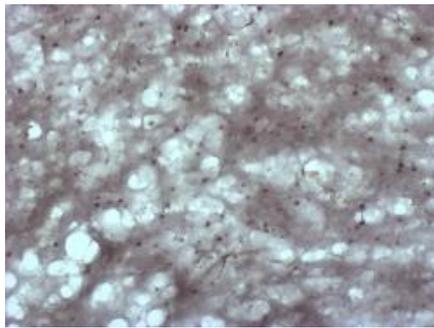
CDB

CDL

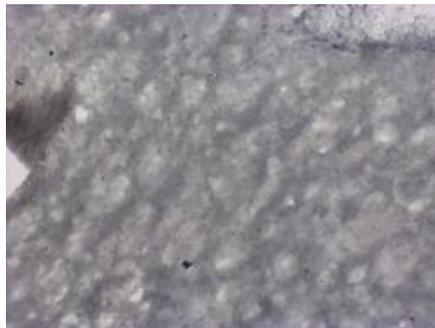
## Cuerpo estriado

### Acc

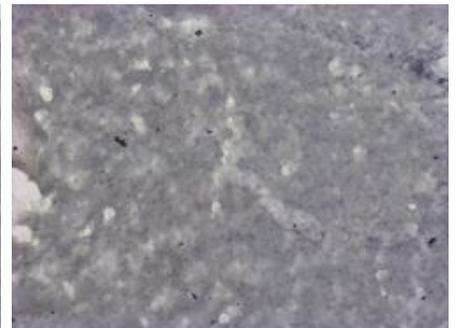
Micrografías de Acc a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



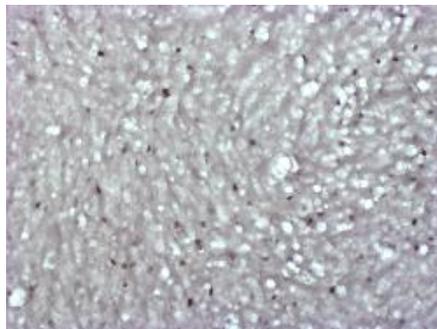
AS



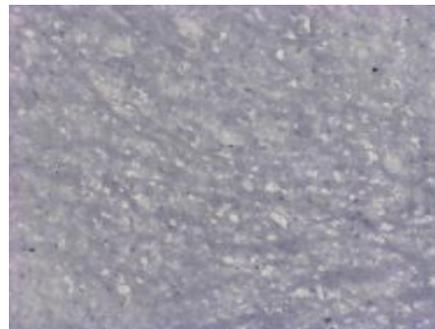
ADB



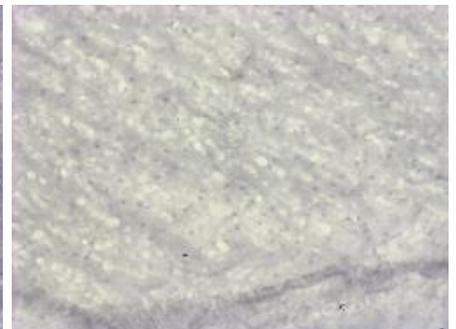
ADL



CS



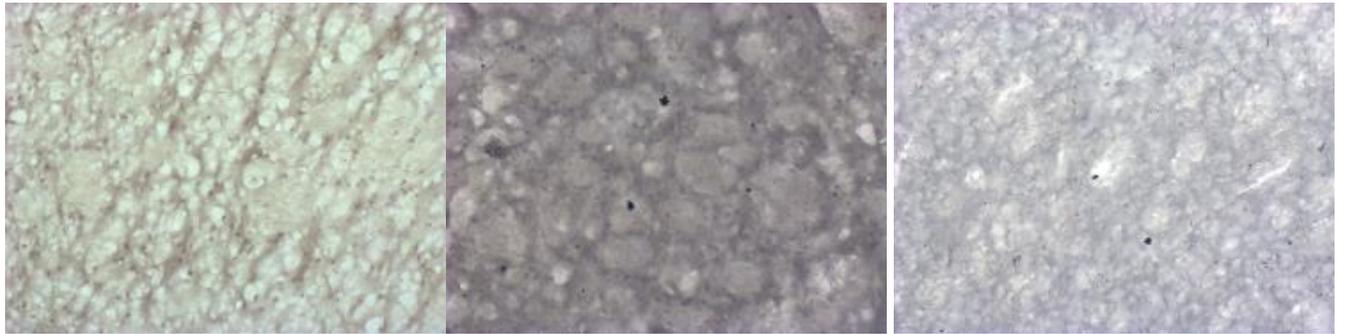
CDB



CDL

## CPu

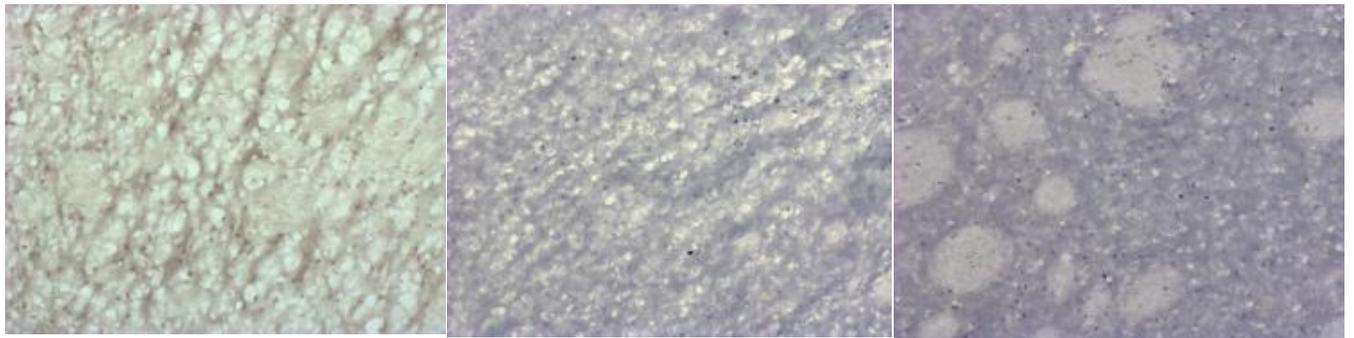
Micrografías de CPu a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS

ADB

ADL



CS

CDB

CDL

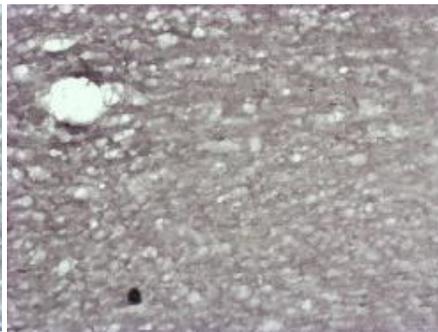
## Hipotálamo

### NHA

Micrografías de NHA a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS



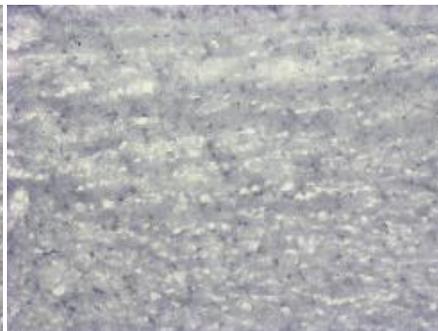
ADB



ADL



CS



CDB



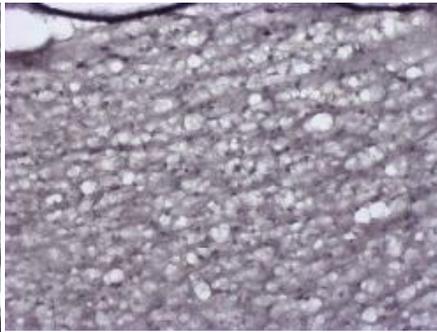
CDL

## NHPV

Micrografías de NHPV a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS



ADB



ADL



CS



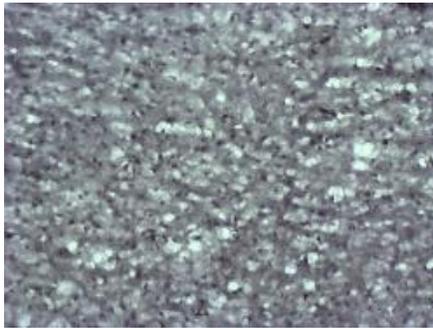
CDB



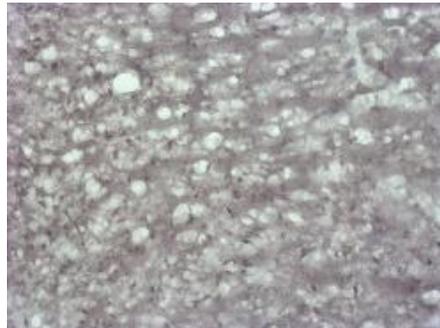
CDL

## NHDMD

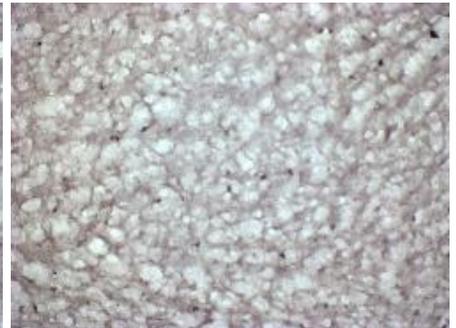
Micrografías de NHDMD a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



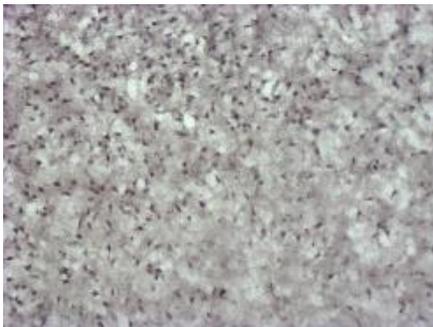
AS



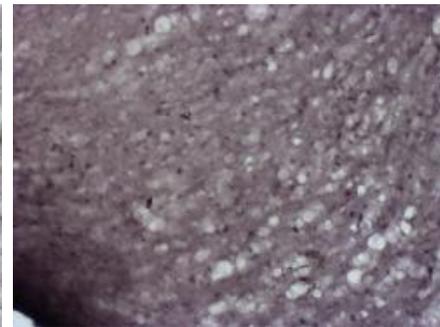
ADB



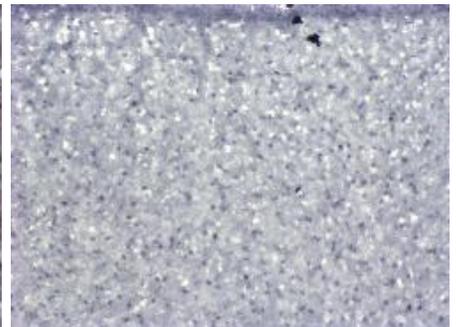
ADL



CS



CDB

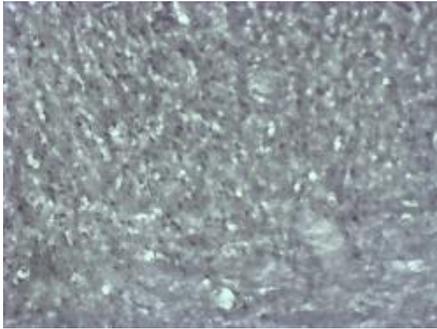


CDL

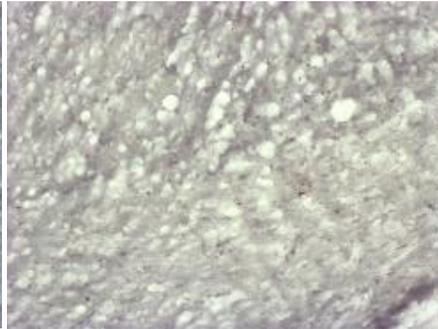
## Complejo amigdalino

### AMePD

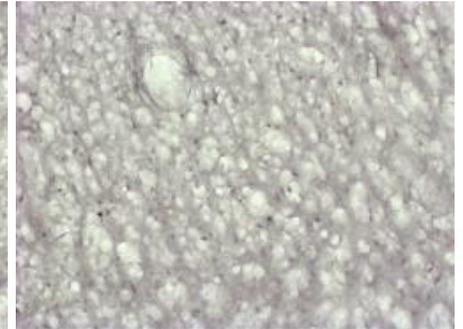
Micrografías de AMePD a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



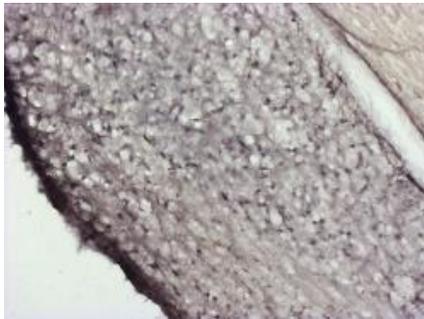
AS



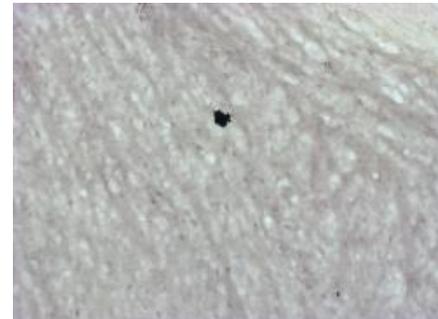
ADB



ADL



CS



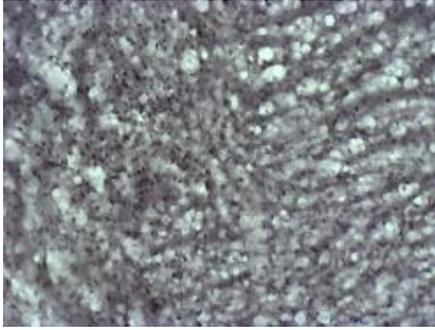
CDB



CDL

## AMePV

Micrografías de AMePV a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS



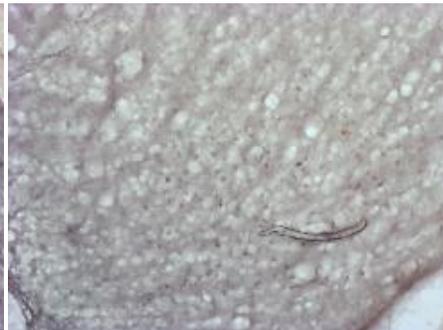
ADB



ADL



CS



CDB



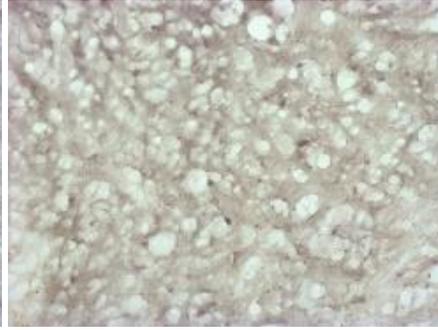
CDL

## ACe

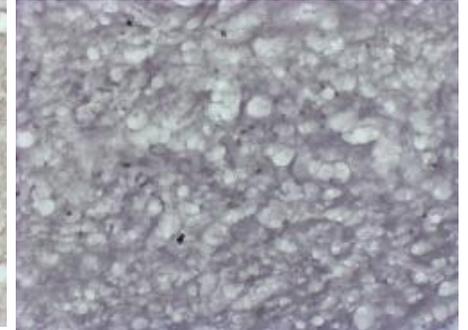
Micrografías de ACe a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



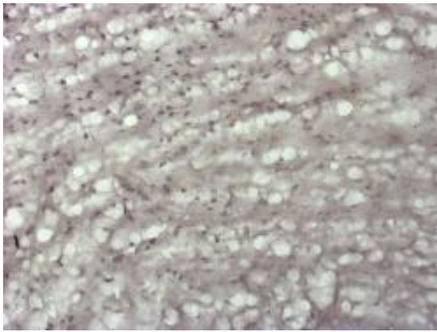
AS



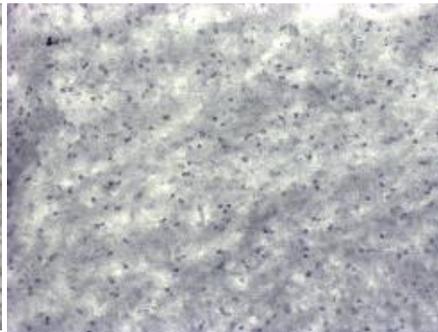
ADB



ADL



CS



CDB



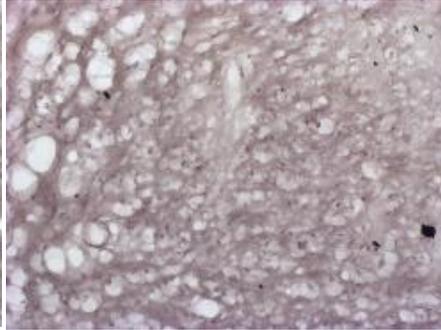
CDL

## ALa

Micrografías de ALa a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS



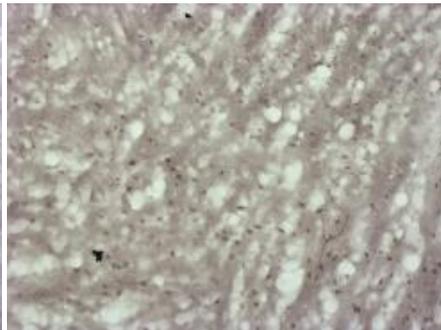
ADB



ADL



CS



CDB

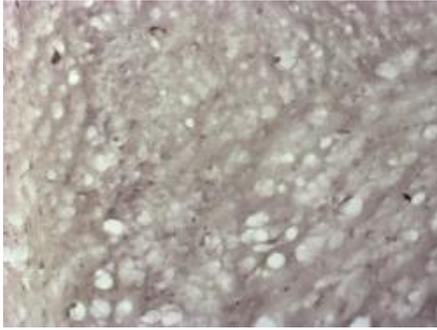


CDL

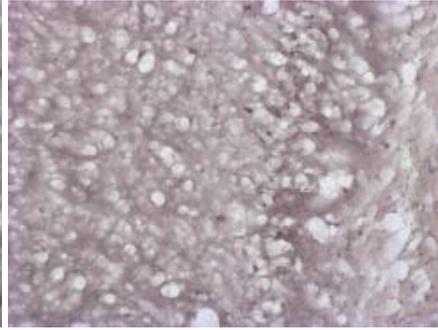
## Hipocampo

### Ca1

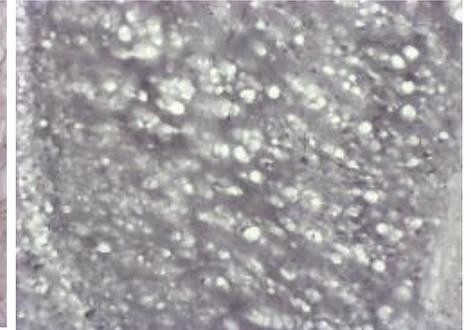
Micrografías de Ca1 a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



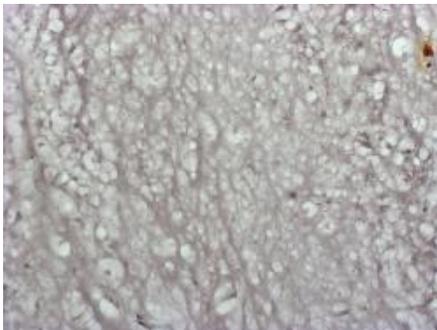
AS



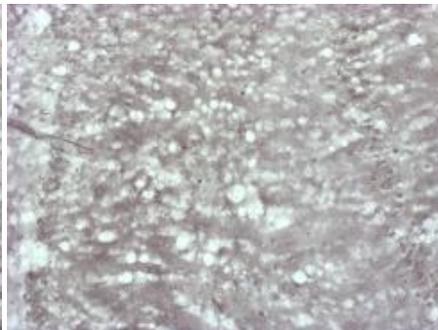
ADB



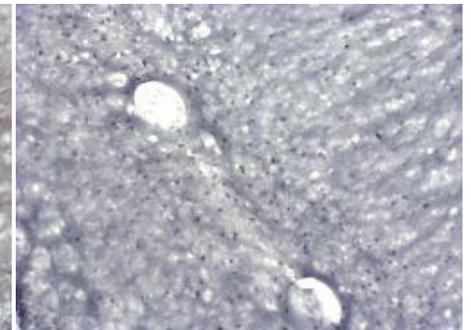
ADL



CS



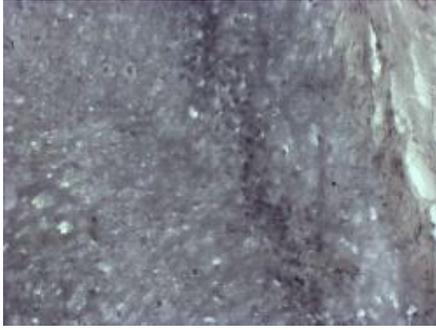
CDB



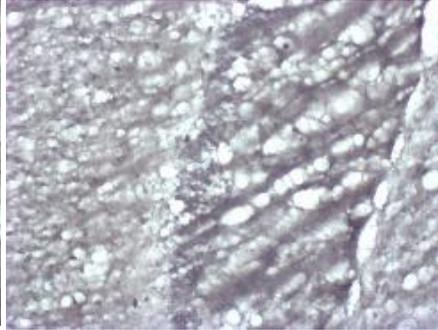
CDL

## Ca<sup>2+</sup>

Micrografías de Ca<sup>2+</sup> a una escala de 1  $\mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



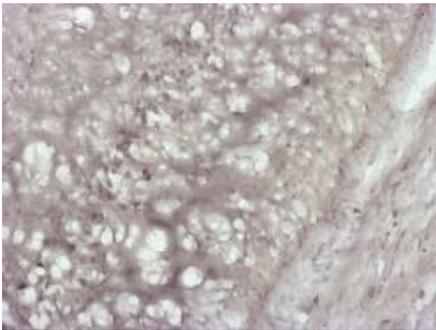
AS



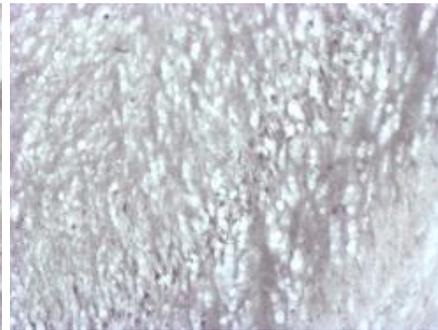
ADB



ADL



CS



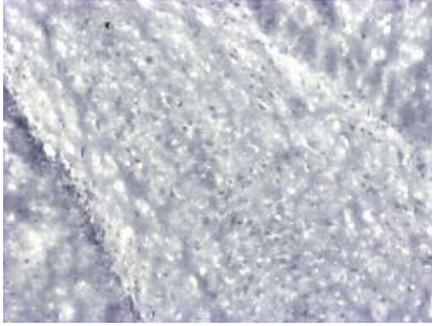
CDB



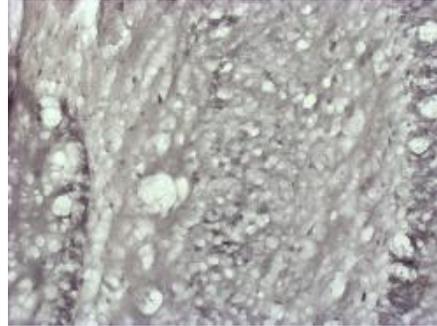
CDL

### Ca3

Micrografías de Ca3 a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



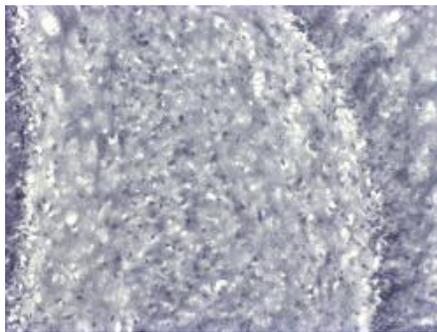
AS



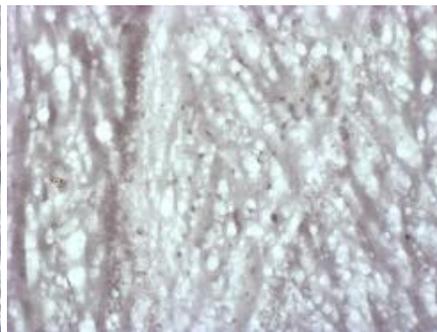
ADB



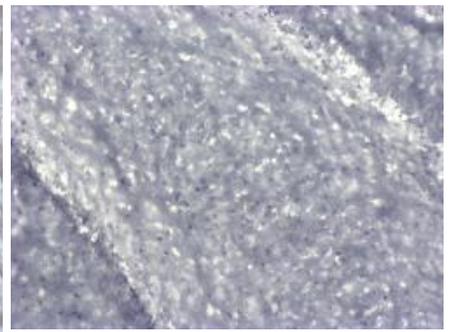
ADL



CS



CDB



CDL

## Tallo

### SGPDL

Micrografías de SGPDL a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS



ADB



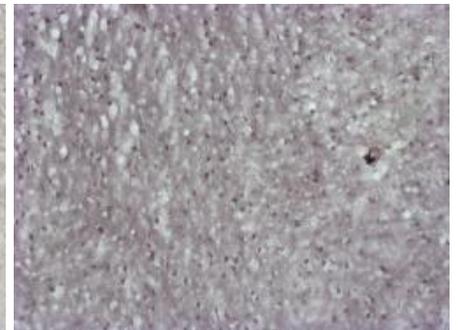
ADL



CS



CDB



CDL

## SGPDM

Micrografías de SGPDM a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS

ADB

ADL



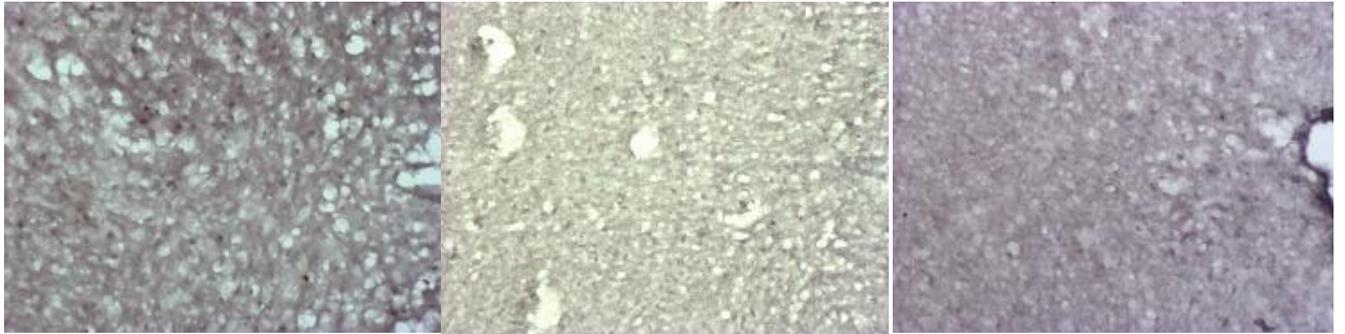
CS

CDB

CDL

## NRD

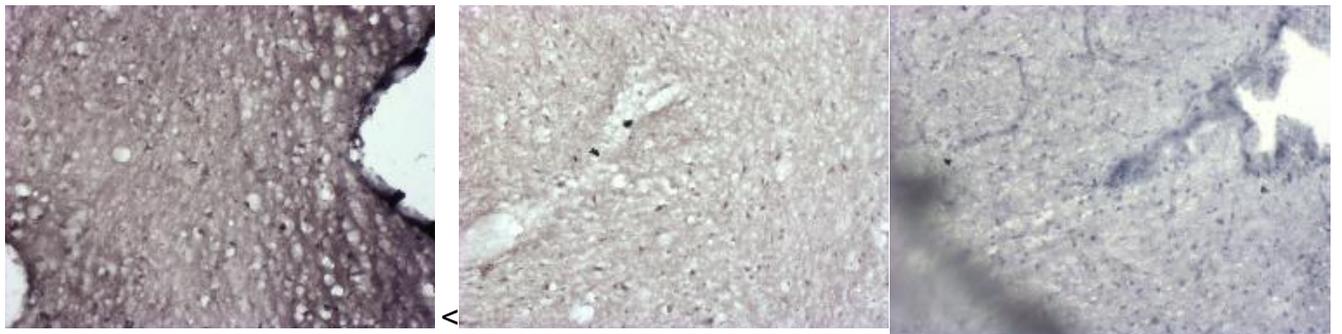
Micrografías de NRD a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS

ADB

ADL



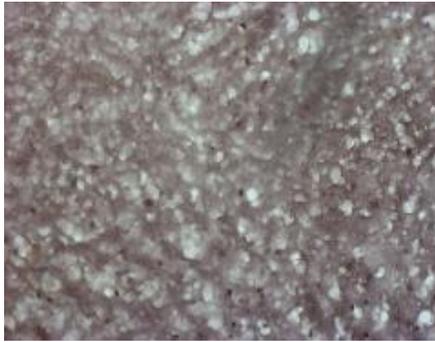
CS

CDB

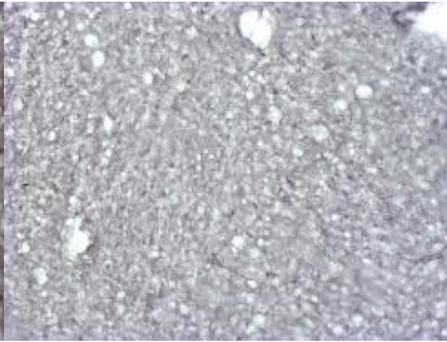
CDL

## NRL

Micrografías de NRL a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



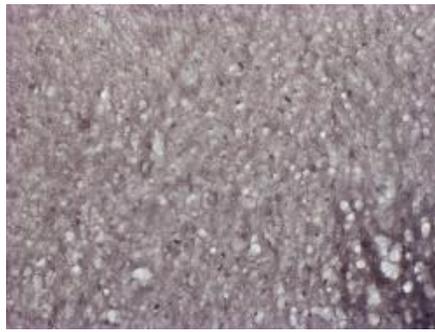
AS



ADB



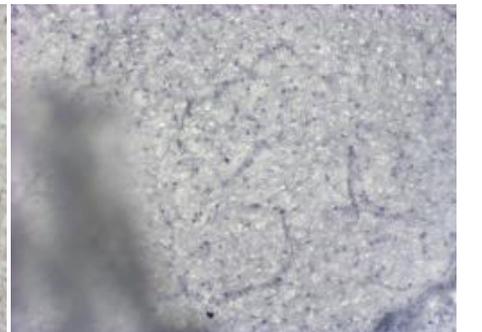
ADL



CS



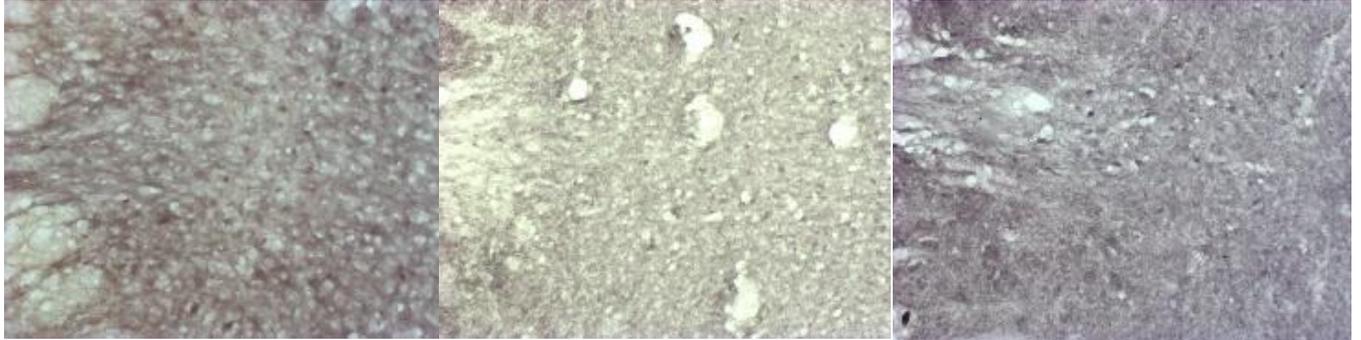
CDB



CDL

## NRV

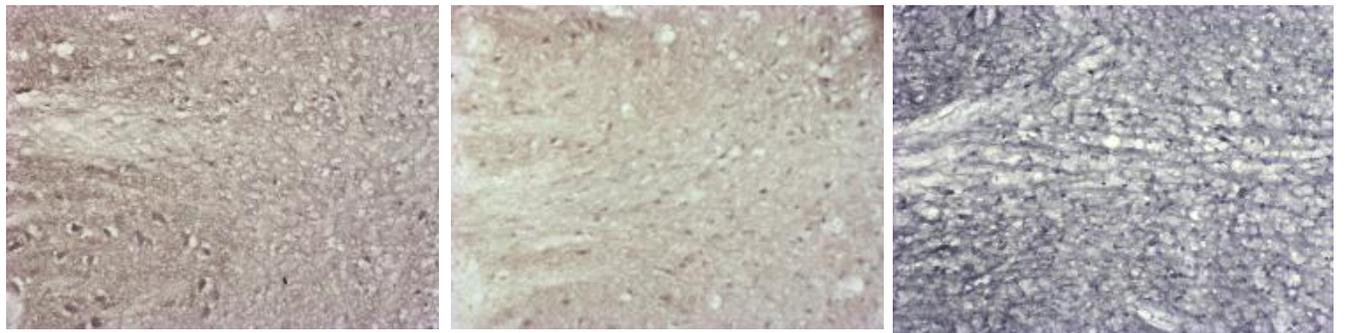
Micrografías de NRV a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS

ADB

ADL



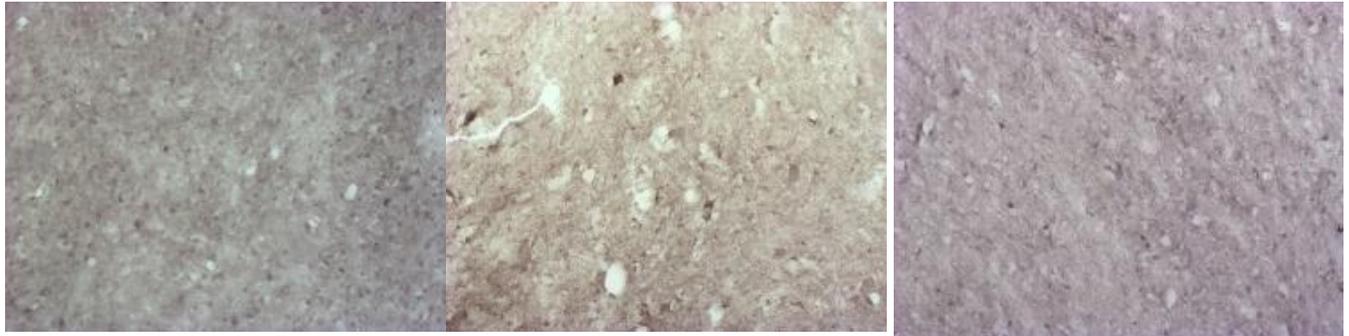
CS

CDB

CDL

## NCCI

Micrografías de NCCI a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS

ADB

ADL



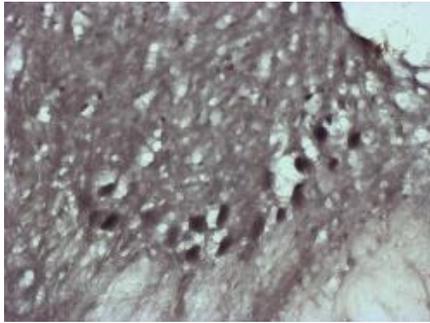
CS

CDB

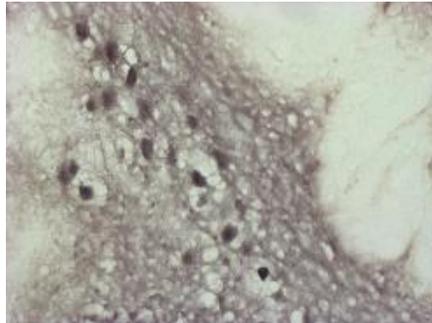
CDL

## LC

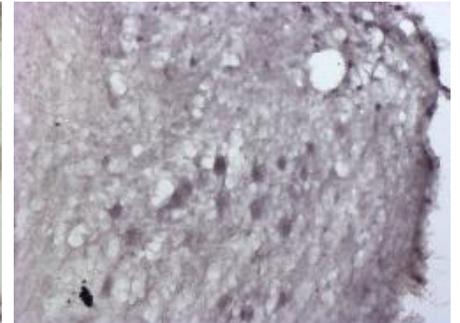
Micrografías de LC a una escala de  $1 \mu\text{m}^2$ . Organizados en grupo por columna y tratamiento por fila. Los puntos negros representan las células inmunorreactivas.



AS



ADB



ADL



CS



CDB



CDL