



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**PSICOLOGÍA**

**ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO Y CONDUCTUAL  
DEL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A GABA EN  
CORTEZA CEREBRAL E HIPOCAMPO**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

**ANGIE MARGARITA MORENO SERRANO**

**JURADO DEL EXAMEN**

**DIRECTOR:** DR. EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

**COMITÉ:** DR. ALEJANDRO VALDÉS CRUZ

LIC. JUAN CARLOS DEL RAZO BECERRIL

DRA. LILIA MESTAS HERNÁNDEZ

DR. VÍCTOR MANUEL MAGDALENO MADRIGAL



**MÉXICO, CDMX.**

**SEPTIEMBRE, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA  
RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Neurobiología de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

Tesis apoyada por el Programa de Becas de inicio a la Investigación (PROBEI) de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (CCINSHAE).



Tesis apoyada por el CONACyT

(Proyecto: 166823)

GRACIAS



## **Agradecimientos**

*A mis padres Margarita Serrano y Julio Moreno por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, confianza, motivación y amor.*

*Al Dr. Eduardo Calixto por su dedicación, colaboración y enseñanza.*

*A todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto, muchas gracias por su apoyo, entrega y tiempo.*

*Infinitas Gracias.*

*"Cada esfuerzo por clarificar lo que es ciencia y de generar entusiasmo popular sobre ella es un beneficio para nuestra civilización global. Del mismo modo, demostrar la superficialidad de la superstición, la pseudociencia, el pensamiento "New Age" y el fundamentalismo religioso es un servicio a la civilización..."*

*Carl Sagan*

## Índice

Lista de Abreviaturas.....	6
Resumen .....	8
Introducción .....	10
<b>I. Antecedentes</b>	
<b>I.1. Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central.....</b>	<b>11</b>
<b>I.1.1 Ácido <math>\gamma</math>-aminobutírico (GABA).....</b>	<b>11</b>
<b>I.1.2 Síntesis y metabolismo del GABA .....</b>	<b>12</b>
<b>I.1.3 Recaptura del GABA .....</b>	<b>14</b>
<b>I.1.4 El receptor GABA<sub>A</sub> .....</b>	<b>15</b>
<b>I.1.5 El receptor GABA<sub>B</sub> .....</b>	<b>17</b>
<b>I.1.6 Fisiología del sistema GABAérgico .....</b>	<b>18</b>
<b>I.1.7 Moduladores del Receptor GABA<sub>A</sub> .....</b>	<b>19</b>
<b>I.1.8 Alteraciones del Sistema GABAérgico .....</b>	<b>21</b>
<b>I.2 Síndrome de Abstinencia a GABA un modelo experimental de hiperexcitabilidad neuronal.....</b>	<b>23</b>
<b>I.3 Memoria .....</b>	<b>28</b>
<b>I.3.1 Tipos de Memoria .....</b>	<b>30</b>
<b>I.3.2 Neurofisiología de la Memoria .....</b>	<b>31</b>
<b>I.3.3 Hipocampo .....</b>	<b>34</b>
<b>I.3.4 Memoria de Reconocimiento .....</b>	<b>36</b>
<b>I.4 Ansiedad .....</b>	<b>38</b>

<b>II.</b>	<b>Justificación</b> .....	41
<b>III.</b>	<b>Objetivos</b> .....	42
	Variables de trabajo .....	43
	Hipótesis .....	44
<b>IV.</b>	<b>Material y Método</b> .....	46
	Sujetos experimentales .....	46
	Sustancias utilizadas en esta investigación .....	46
	Cirugía estereotáxica .....	47
	Registro electroencefalográfico (EEG) .....	48
	Inducción del Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG) .....	49
	Prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC) .....	49
	Prueba de Reconocimiento de Objetos .....	50
	Procedimiento Conductual .....	51
	Habitación .....	51
	Tarea de Reconocimiento de Objetos .....	52
	Análisis de resultados de la memoria .....	53
	Análisis Estadístico .....	54
	Procedimiento Experimental .....	55
<b>V.</b>	<b>Resultados</b> .....	66
<b>VI.</b>	<b>Discusión</b> .....	93
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	107
<b>VIII.</b>	<b>Referencias</b> .....	108

## Lista de Abreviaturas

$\alpha$ - KG	$\alpha$ - cetogluturato
2-DG	2-desoxiglucosa
AloP	Alopregnanolona
AMPA	Ácido Alfa-Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazolpropiónico
BA	Brazos Abiertos
BC	Brazos Cerrados
Bz	Benzodiazepinas
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
CA1	Área CA1 del hipocampo
<sub>CF<sub>3</sub></sub> HEPP	DL-di-CF <sub>3</sub> HEPP
Cl <sup>-</sup>	Ión cloro
Cx	Corteza Cerebral
CxS	Corteza somatomotora
Dz	Diazepam
EE	Error Estándar
EEG	Electroencefalograma
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor ionotrópico a GABA
GABA <sub>B</sub>	Receptor metabotrópico GABA
GABA-T	GABA <i>transaminasa</i>
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GAT	Transportadores de GABA
Glu	Glutamato
h	Hora
H	Hipocampo
Hz	Hertzio (ciclo por segundo)
INPRF	Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente
i.p.	Intraperitoneal
IPSP	Potencial Post-sináptico Inhibitorio
IR	Índice de Reconocimiento
Kg	Kilogramos

LEC	Laberinto Elevado en Cruz
LTP	Potenciación Largo Plazo
MBR	Receptor Mitocondrial de Benzodiazepinas
NE	Neuroesteroides
ml	Mililitros
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
MCP	Memoria Corto Plazo
MLP	Memoria Largo Plazo
NMDA	Receptores de N-metil-D-aspartato
µg	Microgramos
OVX	Ovarectomizadas
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLP	Fosfato de Piridoxal (vitamina B <sub>6</sub> )
PregS	Sulfato de Pregnenolona
Proteínas G	Proteínas de asociadas a nucleótidos de guanina
PTZ	Pentilenetetrazol
SAG	Síndrome de Abstinencia a GABA
SAG Cx	Síndrome de Abstinencia a GABA corteza cerebral
SAG H	Síndrome de Abstinencia a GABA Hipocampo
s.c.	Subcutáneo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SSA	Semialdehído Succínico
SSADH	Succinato Semialdehido Deshidrogenasa
TCA	Ciclo del Ácido Tricaboxílico
5α-R	5α-reductasa
3-HSOR	3-hidroxiesteroide Oxidoreductasa



## Resumen

El síndrome de abstinencia a GABA (SAG) es un modelo de incremento en la excitabilidad neuronal, originado por la interrupción abrupta de la instilación intracortical de GABA. Estudios previos indican que antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, mejoran el rendimiento en tareas de memoria, en contraste, agonistas como muscimol y diazepam, disminuyen la formación de la memoria. Por sus cambios sinápticos, el SAG asemeja los efectos epileptiformes de la bicuculina, pero no conocemos si modifica la memoria.

Con el objetivo de cuantificar las diferencias electrofisiológicas y conductuales del SAG en dos distintas áreas cerebrales: corteza cerebral (SAG Cx) y área CA1 del hipocampo (SAG H), y su impacto en la memoria. Se realizó la instilación de GABA en la corteza cerebral y área CA1 del hipocampo en ratas macho de la cepa Wistar. Los resultados indican que la hiperexcitabilidad neuronal generada por la abstinencia a GABA en la corteza cerebral tiene una duración de 10 días, presenta una frecuencia de descarga de 1.2 espigas/seg y un incremento en la potencia EEG de 173%; en el área CA1 del hipocampo hay un incremento mayor en la potencia EEG de 210% se presenta una frecuencia de descarga de 1.6 espigas/seg y tiene una duración de 15 días, el SAG en dos distinta áreas cerebrales no modifica la memoria a corto y largo plazo validado por la prueba de reconocimiento de objetos. Asimismo, la interrupción abrupta de la

instilación de GABA en la corteza cerebral y el área CA1 del hipocampo induce un perfil tipo ansioso semejante. Los resultados muestran que el SAG H tiene mayor potencia electrofisiológica, mayor duración y presenta un incremento mayor en la actividad epileptiforme comparado con el SAG Cx, sin embargo la inducción de la abstinencia en dos distintas áreas cerebrales no modifica la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo, aunque se presenten niveles de ansiedad similares. No obstante de la similitud de cambios que tienen ambas estructuras cerebrales: en la disminución de liberación de GABA, *down regulation* del receptor GABA<sub>A</sub> e incremento en la conductancia de Ca<sup>2+</sup> post sináptico el hipocampo muestra una mayor excitabilidad sin inferir en los cambios conductuales y de memoria.

## **Introducción**

La presente tesis tiene como objetivo cuantificar las diferencias electrofisiológicas, conductuales del SAG Cx y el SAG H, y su efecto mediante la interrupción abrupta de la instilación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). La interrupción del GABA genera un aumento en la actividad neuronal seguida de cambios sinápticos y electrofisiológicos. El SAG es un modelo de hiperexcitabilidad neuronal validado mediante el electroencefalograma (EEG) en el que aparecen complejos espiga-onda de gran amplitud y frecuencia. En esta tesis primero se exponen los antecedentes en donde se describe el sistema GABAérgico, su fisiología, receptores y farmacología, continuando con la descripción del Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG), los hallazgos relacionados con la correlación entre GABA, memoria y antecedentes inmediatos en el campo de las neurociencias que involucran al SAG con los moduladores del receptor GABA<sub>A</sub> y la ansiedad.

## **I. Antecedentes**

### **I.1 Neurotransmisión GABAérgica en el Sistema Nervioso Central**

#### **I.1.1 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)**

Dentro del sistema nervioso central (SNC) las sinapsis más abundantes son inhibitorias, estas sinapsis inhibitorias utilizan el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA; Olsen y Betz, 2006; Schousboe y Waagepetersen, 2007; Schousboe y Waagepetersen, 2008; Cortes-Romero *et al.*, 2011).

En los 50's del siglo pasado Eugene Roberts y Jorge Awapara descubrieron que el cerebro era el órgano que más GABA contenía, sin embargo, fue aceptado como neurotransmisor hasta la década de los 60's (Jorgensen, 2005).

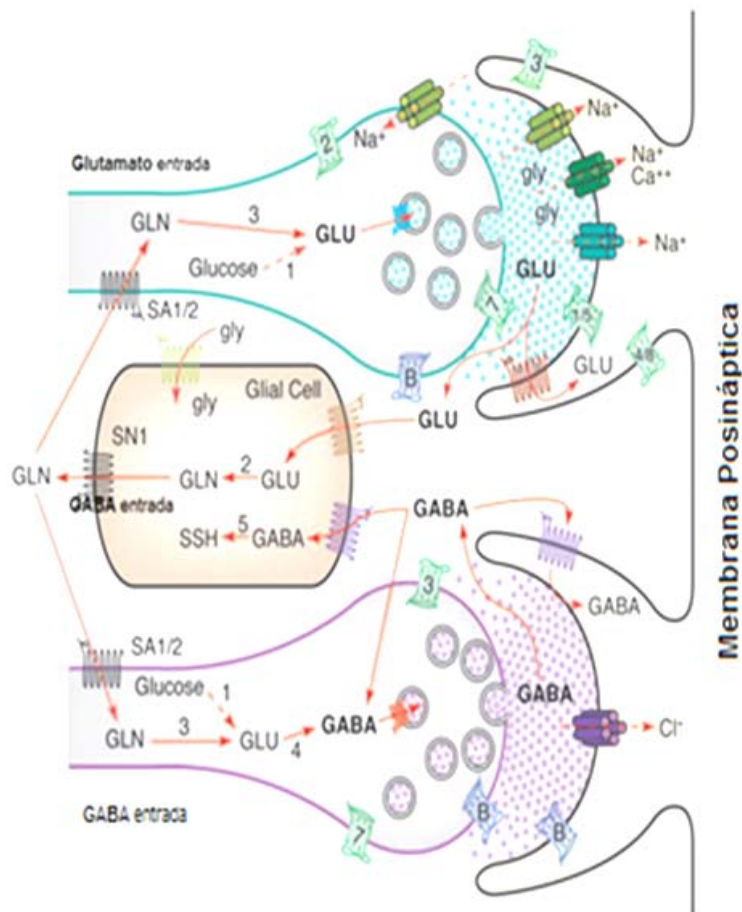
En 1967, Krnjeviè y Schwartz encontraron la primera evidencia de que el GABA actuaba como un neurotransmisor inhibitorio mediante el análisis de las propiedades de los potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP) demostraron que la acción del GABA era hiperpolarizar a la neurona postsináptica, disminuyendo de esta manera la posibilidad de que una neurona genere un potencial de acción; el mecanismo de esta inhibición se da debido a que el GABA al unirse a su receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>, aumenta la corriente entrante de Cl<sup>-</sup> volviendo el interior de la célula más negativo, disminuyendo así la excitabilidad neuronal (Carlson, 2006). Posteriormente, se demostró que además de actuar como principal

neurotransmisor inhibitor en el cerebro de los mamíferos, el GABA podía ejercer otras funciones como promotor de la sinaptogénesis (Wolff, 1981).

### **I.1.2 Síntesis y metabolismo del GABA**

El ácido glutámico (glutamato) es el aminoácido precursor inmediato de la biosíntesis del GABA (Fig. 1), mediante la intervención específica de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), esta enzima produce una descarboxilación y para activarse requiere como coenzima la presencia de fosfato de piridoxal (PLP). Al concluir la síntesis del GABA, es transportado y almacenado en vesículas sinápticas hasta el momento de su liberación en el espacio sináptico (Waagepetersen *et al.*, 2001).

El GABA es catabolizado por reacciones de transferencia del grupo amino para posteriormente entrar al ciclo de Krebs (ciclo de los ácidos tricarboxílicos), por medio de la enzima GABA-Transaminasa (GABA-T), esta enzima se encuentra localizada en la fracción mitocondrial de la célula donde transforma el GABA en semialdehído succínico (SSA), metabolito que se utiliza para la síntesis de ácido glutámico y que se oxida mediante el succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) formando ácido succínico (Mendoza, 2008).



**Figura 1.** Gráfico representativo de los sistemas de neurotransmisión GABAérgico y glutamatergico. Las rutas metabólicas o enzimas están indicadas con los siguientes números: 1. Glucólisis/ ciclo de Krebs; 2. Glutamina sintetasa; 3. Glutaminasa; 4. Glutamato descarboxilasa (GAD); 5. Succinato deshidrogenasa. En la parte superior (sinapsis de Glutamato; Glu) se hace referencia a los recapturadores de Glu (2 y 7) así como los receptores ionotrópicos (que permiten el ingreso de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , en el componente postsináptico) y metabotrópicos (1,5 y 4,6). En el gráfico inferior del panel izquierdo, se observa el papel de metabólico de la glía e inferior a ella, una sinapsis GABAérgica, identificando los transportadores de glutamina (GLN-SA1/2), los receptores  $\text{GABA}_B$  (B) y el receptor  $\text{GABA}_A$  (A) que permite el ingreso de  $\text{Cl}^-$  al componente postsináptico. En la parte derecha se muestran los iconos utilizados que hacen referencia a los diferentes tipos de receptores para estos neurotransmisores (Imagen modificada de Foster *et al.*, 2006).

### I.1.3 Recaptura del GABA

El GABA es recapturado por un mecanismo de transporte activo a la presinapsis, donde nuevamente es incorporado a las vesículas sinápticas (Mendoza, 2008). La función primordial del sistema de recaptura es remover del espacio sináptico el GABA para la inactivación de su efecto. Esto es modulado por una serie de transportadores de alta afinidad para el GABA, denominados GAT, los cuales son proteínas de doce pasos transmembranales cuya activación depende del gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  por lo que es dependiente de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Olsen, 2000).

Actualmente se han identificado 4 tipos de transportadores (GAT 1-4). Los transportadores más abundantes dentro del SNC de los mamíferos son GAT 1 y GAT 4 se encuentran localizados principalmente en las terminaciones nerviosas. En la glía, están presentes GAT-2 y el GAT-3 está altamente expresado en las leptomeninges y en el plexo coroideo. El proceso de recaptura es modulado por la actividad de segundos mensajeros. Tiene sitios para ser fosforilado: uno para proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) y siete para proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés), (Bowery, 1990; Nelson *et al*, 1990).

Las sinapsis GABAérgicas a nivel pre y post sináptico ejercen su función en relación a interacciones macromoleculares que se realizan a través de distintos receptores. El GABA desempeña su papel inhibitor por medio de dos tipos de receptores; ionotrópicos en

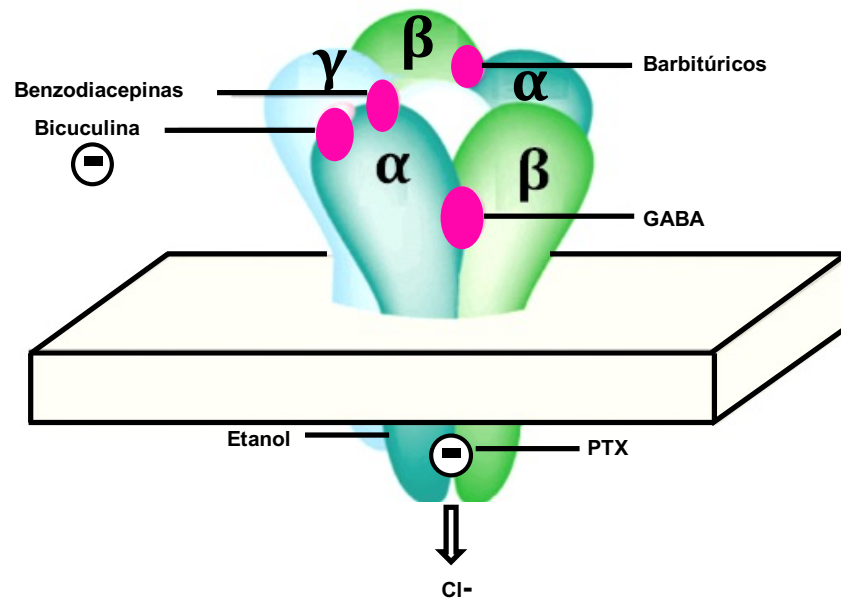
los cuales se encuentra el receptor GABA<sub>A</sub> y metabotrópicos GABA<sub>B</sub> (Schousboe y Waagepetersen, 2008).

#### **I.1.4 El receptor GABA<sub>A</sub>**

El receptor GABA<sub>A</sub> (Fig. 2), es una estructura heteromérica conformada por cinco subunidades de naturaleza proteica, que constituyen y forman un canal que permite la entrada de iones de Cl<sup>-</sup> o bicarbonato (Magnaghi, 2007). Se han identificado 19 subunidades diferentes ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\rho$ 1-3) que al combinarse determinan principalmente las propiedades farmacológicas y biofísicas del receptor (Cuzon y Yeh, 2011). La heterogeneidad de las combinaciones de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> forman diferentes sitios de unión para varios fármacos clínicamente importantes, incluyendo las benzodiazepinas, barbitúricos, etanol y neuroesteroides. Cada subunidad está compuesta de un dominio N-terminal extracelular (NH<sub>2</sub>), cuatro segmentos transmembranales (M1-M4) con un extremo C-terminal extracelular y un asa intracelular (Watanabe 2002).

El mecanismo sináptico de los receptores GABA<sub>A</sub> está implicado en la regulación de la vigilancia, la ansiedad, la depresión, funciones de la memoria y desempeña una función crítica para mantener el nivel adecuado en la transmisión sináptica inhibitoria y la función fisiológica (Gasbarri y Pompili, 2014).





**Figura 2. Representación de la estructura del receptor GABA<sub>A</sub>.** Es un heteropentámero que en su forma más común contiene dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una  $\gamma$  o  $\delta$ , que en conjunto comprenden el canal iónico central, que permite el paso de iones de  $\text{Cl}^-$  hiperpolarizando la neurona. El receptor tiene sitios de unión para varios fármacos clínicamente importantes como los barbitúricos, benzodiacepinas, el etanol y los neuroesteroides. (Imagen modificada de Reddy, 2003).

El subtipo de receptor GABA<sub>A</sub> más común está constituido por las subunidades  $\alpha\beta\gamma$ , pero existen múltiples combinaciones, varían en diferentes regiones del cerebro (Tabla 1), tipos de células y etapas del desarrollo, en el SNC la isoforma predominante es  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$  (Lagrange, Botzolakis y Macdonald, 2007). La composición de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> tiene un papel importante en las propiedades intrínsecas, incluyendo la afinidad por el GABA, la cinética del canal, la conductancia, la modulación alostérica, la probabilidad de apertura de los canales y la interacción con proteínas moduladoras (Scharfman y Brooks-Kayal, 2014).

**Tabla 1. Isoformas y distribución en el SNC del receptor GABA<sub>A</sub>**

<b>Isoformas GABA<sub>A</sub></b>	<b>Distribución en el SNC</b>
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Capa granular del bulbo olfatorio, capa de células polimorfas y región CA3 del hipocampo, corteza cerebral, globo pálido y varios núcleos subtalámicos.
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	Bulbo accesorio olfatorio, el estriado, el septum, la capa molecular del giro dentado e hipocampo.
$\alpha_4\beta\gamma_2$	Tálamo, caudado, putamen y giro dentado.
$\alpha_4\beta_3\delta$	Células granulares de giro dentado, la corteza cerebral y predominantemente en el estriado.
$\alpha_4\beta_3\gamma_2$	Neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.

**Tabla 1. Isoformas y distribución del receptor GABA<sub>A</sub>.** En la columna de la izquierda se presentan las subunidades que componen las diferentes isoformas del receptor GABA<sub>A</sub>, en la columna de la derecha se muestra su distribución en el SNC (Tabla modificada de Miguel, 2012).

La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> da como resultado dos tipos de inhibición GABAérgica: fásica y tónica. La inhibición fásica se produce por la activación de receptores postsinápticos; y la inhibición tónica se produce mediante la activación continua de receptores extrasinápticos (Feng, 2010).

### **1.1.5 El receptor GABA<sub>B</sub>**

Los receptores GABA<sub>B</sub> son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, de siete dominios transmembranales, que modulan la actividad de los canales de potasio (K<sup>+</sup>) y calcio

dependientes de voltaje ( $\text{Ca}^{2+}$ ), así como también, inhiben la actividad de la enzima adenilato ciclasa y participan en el componente lento y prolongado de la inhibición sináptica (Bettler *et al.*, 2004 y Bowery *et al.*, 2004). Los receptores  $\text{GABA}_B$  pueden funcionar como autoreceptores, inhibiendo la liberación de GABA y heteroreceptores, inhibiendo la liberación de otros neurotransmisores (Pinard, Seddik y Bettler, 2010).

La activación de los receptores postsinápticos  $\text{GABA}_B$  activa a los canales de  $\text{K}^+$ , hiperpolarizando la membrana (Heaney y Kinney, 2016). Farmacológicamente los receptores  $\text{GABA}_B$  se diferencian de los receptores  $\text{GABA}_A$  por ser insensibles a la bicuculina y por su activación selectiva con el baclofén (Bormann, 2000; Pin *et al.*, 2004).

Se han identificado receptores  $\text{GABA}_B$  en el sistema nervioso central (SNC), el sistema nervioso periférico (SNP), así como en varios órganos periféricos. Las regiones del SNC que tienen mayor expresión de receptores  $\text{GABA}_B$  son el hipocampo, núcleos talámicos, el cerebelo, la amígdala cerebral, la corteza y la habénula (Filip *et al.*, 2015).

### **I.1.6 Fisiología del sistema GABAérgico**

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos, tiene un papel fundamental en la modulación y regulación de la actividad neuronal. Sus efectos fisiológicos se producen a través de tres diferentes tipos de receptores (Nazari *et al.*, 2016). A nivel presináptico se observa una activación del receptor  $\text{GABA}_B$  que produce una disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al botón

terminal, ocasionando así una disminución de liberación de neurotransmisores (Pinard *et al.*, 2010). En algunas neuronas, el incremento de la conductancia lenta de  $K^+$  genera potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSP), los cuales pueden ser rápidos (menos de 100 ms) o lentos (más de 100 ms) (Bowery *et al.*, 2002).

Al unirse el GABA al receptor postsináptico, se abre un canal de  $Cl^-$ ; en la mayoría de los casos el potencial eléctrico del  $Cl^-$  en las neuronas, es menor que el del ambiente extracelular, el cual es de 10 a 20 veces mayor (150 mM). La apertura de los canales de  $Cl^-$  crea un flujo al interior de la célula aumentando el número de cargas negativas hiperpolarizando la membrana neuronal contribuyendo a la inhibición (Carlson, 2006).

### **I.1.7 Moduladores del receptor GABA<sub>A</sub>**

Los receptores GABA<sub>A</sub> tienen un papel primordial en la regulación de la excitabilidad neuronal, la heterogeneidad de sus receptores brinda las bases para la flexibilidad de la transducción de señales y la modulación alostérica inducida por fármacos (Sigel y Steinmann, 2012). El receptor GABA<sub>A</sub> se compone de diferentes subunidades con varios dominios funcionales para diversos fármacos clínicamente importantes incluyendo las benzodiazepinas (Bz), neuroesteroides (NE), etanol y barbitúricos (Uusi-Oukari y Korpi, 2010).

Las benzodiazepinas, se utilizan clínicamente como anticonvulsivos, sedantes, hipnóticos, ansiolíticos y relajantes musculares. Son moduladores alostéricos positivos del receptor

GABA<sub>A</sub>, las subunidades  $\alpha_1$  y  $\gamma_2$  son el sitio de unión de las Bz, su acción farmacológica reside principalmente por el aumento de la frecuencia de apertura del canal mejorando así la conductancia (Jacob *et al.*, 2012).

Los mecanismos moleculares que subyacen la acción farmacológica de los barbitúricos se han identificado mediante estudios electrofisiológicos que demostraron que los anestésicos tienen por lo menos tres mecanismos de acción distintos: 1) mejoran la respuesta a GABA (Lin *et al.*, 1992), 2) activan de forma directa los receptores GABA<sub>A</sub> (Franks y Lieb, 1994) y 3) bloquean el canal de Cl<sup>-</sup> en altas concentraciones (Brandon y Fischer; 2006). Los barbitúricos son potentes depresores del SNC con propiedades sedativas, hipnóticas y anestésicas, disminuyen el consumo de oxígeno cerebral (Belelli y Lambert, 2005).

El efecto de los NE sobre el receptor GABA<sub>A</sub> depende del tipo de esteroide (agonista o antagonista), el tipo de receptor, la composición de subunidades y la estructura del esteroide. Se han identificado al menos dos acciones de los NE, la acción agonista; que modula de forma positiva al receptor, por medio de un incremento en la corriente de entrada de Cl<sup>-</sup> y una activación directa del receptor (Wang, 2011). En contraste la modulación negativa del receptor GABA<sub>A</sub> por parte de los NE parece implicar específicamente a los NE sulfatados. Así, la presencia o ausencia del grupo sulfato modifica la interacción del NE con el receptor GABA<sub>A</sub>, inhibiendo la entrada de Cl<sup>-</sup> y reduciendo la frecuencia de apertura del canal sin modificar la

duración de apertura (Darnaudéry, Pallarès, Piazza, Le y Mayo, 2002).

Los agonistas GABAérgicos como el muscimol y la isoguvacina potencian la actividad GABAérgica, en cambio los antagonistas como la bicuculina y flumazenil bloquean la actividad GABAérgica. Kim et al. (2012), demostraron que la administración de bicuculina en el área CA1 del hipocampo mejora la consolidación de la memoria, en contraste la administración de agonistas tales como el muscimol y el diazepam interrumpen la formación de la memoria.

### **I.1.8 Alteraciones del sistema GABAérgico**

La alteración del equilibrio entre la excitación e inhibición neuronal genera condiciones patológicas que se manifiestan en distintos trastornos psiquiátricos como: la esquizofrenia, la ansiedad, la epilepsia y la depresión (Hines *et al.*, 2012 ).

La administración crónica de moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub> genera alteraciones conformacionales de los receptores (Saari *et al.*, 2011). Las hormonas esteroideas son neuromoduladoras del estado de ánimo, se ha demostrado que la exposición crónica de alopregnanolona durante el ciclo estral y el embarazo induce tolerancia que se acompaña de cambios en la expresión de la subunidad del receptor (Turkmen *et al.*, 2011 ).

Cambios en la neurotransmisión GABAérgica están relacionados con la generación de la epilepsia (Pirker *et al.*, 2003). La patogénesis de la epilepsia tiene un fuerte determinante genético, teniendo en cuenta que mutaciones secuenciales o anomalías

estructurales cromosómicas, alteran la expresión neuronal de una determinada subunidad para un canal iónico o alguna proteína membranal, provocando anomalías estructurales y funcionales del paso selectivo de  $\text{Cl}^-$  dando como resultado, alteraciones de la excitabilidad neuronal (Cabo de la Vega *et al.*, 2006; Macdonald, Kang, y Gallagher, 2010).

En pacientes con epilepsia, se han identificado distintas mutaciones en las subunidades  $\gamma 2$ ,  $\alpha 1$  y  $\delta$  de los receptores  $\text{GABA}_A$  (Jacob, Moss y Jurd, 2008). Fisher, (2004) identificó que una mutación de la subunidad  $\alpha 1$  del receptor  $\text{GABA}_A$  que es el subtipo de expresión más amplia de la subunidad  $\alpha$ , reduce la sensibilidad farmacológica aumenta la tasa de desactivación y reduce el tiempo de apertura del canal, sin afectar la conductancia. Los efectos sobre la sensibilidad de GABA, la desactivación y el tiempo de apertura del canal se cuantificaron mediante una reducción en la eficacia de la compuerta del canal y una disminución en la neurotransmisión GABAérgica, causando hiperexcitabilidad en el cerebro y convulsiones generalizadas. Estos resultados mostraron que la mutación de la subunidad de receptor  $\text{GABA}_A$  puede contribuir al desarrollo de la epilepsia por medio de una variedad de efectos sobre la función del receptor.

## **I.2 El Síndrome de Abstinencia a GABA un modelo experimental de hiperexcitabilidad neuronal**

Durante el proceso de una investigación que analizaba la relación entre el GABA y la epilepsia, se identificó y cuantificó un fenómeno de hiperexcitabilidad cortical consecutivo a la interrupción del tratamiento con GABA en el mandril fotosensible *Papio papio* (Brailowsky, 1991; Brailowsky *et al.*, 1989). La estimulación luminosa intermitente en estos monos, inducía la aparición de descargas epilépticas a nivel de la corteza cerebral acompañadas de mioclonías generalizadas. Por medio de cánulas intracorticales se realizó la infusión directa de GABA en la corteza, generando así, un efecto anticonvulsivo. No obstante, al día siguiente de haber suspendido la instilación intracortical de GABA, se constató en todos los monos, la presencia de focos de actividad paroxística. Mediante el análisis electroencefalográfico se observó que, independientemente del área de infusión, el electrodo de registro EEG mostró la aparición de poliespigas y actividad en forma de espiga-onda, que en el caso de la corteza motora, se correlacionaba con la aparición de mioclonías (Brailowsky *et al.*, 1988).

Posteriormente se confirmó la presencia del fenómeno de hiperexcitabilidad en la rata epiléptica (kindling amigdalino) y en la rata no epiléptica (Brailowsky *et al.*, 1987). El fenómeno se estandarizó, valido conductual y electroencefalográficamente (Brailowsky *et al.*, 1988). A este fenómeno de hiperexcitabilidad cortical generado por la interrupción abrupta de la instilación



intracortical de GABA se le llamó “Síndrome de abstinencia al GABA” (SAG; Silva-Barrat *et al.*, 1992).

Además de las crisis convulsivas, los animales mostraban otros signos clínicos tales como mioclonus de la pata posterior contralateral al hemisferio instilado, movimiento incesante de las vibrisas, irritabilidad y aumento de la conducta exploratoria. Se cuantificaron datos de dependencia física ya que la re-infusión de GABA hizo que desaparecieran las manifestaciones EEG. Asimismo existen datos de tolerancia cruzada a (Dz) y a barbitúricos (pentobarbital), debido a que la administración de estas drogas GABAérgicas no modificaban la frecuencia de disparo de la descarga epiléptica en las primeras 24 h (Brailowsky *et al.*, 1992).

Se cuantificó mediante la técnica de la captura/metabolismo de la 2-desoxiglucosa (2DG) radioactiva, un aumento significativo (tres a cinco veces en relación al control) en el consumo local de glucosa del área cortical involucrada en la generación de actividad paroxística y también en la zona talámica ipsilateral de proyección: núcleos posterior oralis, ventro-posterolateral, central-lateral, ventro-lateral y reticular; en cerebros de ratas obtenidos 60 min después del retiro abrupto del GABA. El incremento de la actividad metabólica oxidativa en estas regiones, corresponde con las áreas de gliosis-reactiva identificadas en los cerebros de animales obtenidos 10 días después de haberse interrumpido la actividad paroxística (Menini *et al.*, 1991).

En investigaciones consecutivas, se encontró que posterior a las infusiones crónicas intracorticales de GABA, la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) disminuyó un 40% a nivel del sitio de infusión del aminoácido (Salazar *et al.*, 1994).

Experimentos dirigidos a evaluar el papel de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> en el SAG, demostraron que para el inicio es un fenómeno dependiente del primero. El fundamento que apoya esta afirmación es farmacológico: por una parte, se identificó que es posible inducir un foco epiléptico al interrumpir infusiones localizadas de isoguvacina, un agonista GABA<sub>A</sub> específico, y por la otra, la constatación de que los agonistas específicos del receptor GABA<sub>B</sub> como el baclofén inducen el foco epiléptico durante su instilación y no cuando estos se retiran (Brailowsky *et al.*, 1990, Brailowsky, 1991).

El mecanismo neuronal de la hiperexcitabilidad de este modelo es la consecuencia de cambios consecutivos y dinámicos en los componentes presinápticos y postsinápticos. Dentro de los componentes presinápticos, hay una reducción en la síntesis y liberación de GABA por la disminución en la expresión y actividad de la GAD, lo que incide en la disminución de la liberación y la concentración de GABA en el espacio sináptico. Las modificaciones postsinápticas implican una disminución en la densidad de receptores GABA<sub>A</sub> y de forma gradual, los nuevos receptores GABA<sub>A</sub> tienen una menor sensibilidad farmacológica a causa de los cambios en la expresión de las subunidades que lo conforman. Finalmente el incremento de la excitabilidad neuronal se ve favorecido por un

aumento en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula (Calixto, 2012; Calixto, 2016).

Este modelo, en rebanadas de cerebro se identifica por el incremento en la sincronización de disparo de neuronas piramidales y por cambios en las propiedades excitables de la membrana neuronal (Calixto, 2016). En las neuronas de la corteza cerebral y del hipocampo, a nivel molecular se ha observado una *down regulation* de los receptores  $\text{GABA}_A$  causada por una presencia continua y una elevada concentración de GABA (Calixto *et al.*, 2000).

El estudio del sistema de inducción del SAG, indica que los mecanismos de inicio de la abstinencia se dan mediante cambios en la neurotransmisión GABAérgica y posteriormente se involucran modificaciones de otras neurotransmisiones, es decir que la actividad epileptiforme observada en el EEG, inducida por el retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA, depende de una modificación sináptica que comienza por la disminución del tono GABAérgico. Consecutivamente se incrementa la actividad de los receptores a glutamato (NMDA y AMPA), asociado al aumento del tono colinérgico y adrenérgico. No obstante, no se producen modificaciones en la actividad serotoninérgica (Katsura *et al.*, 2007).

Estudios realizados en nuestra línea de investigación identificaron que la abstinencia a GABA en las primeras 24 h, es dependiente exclusivamente de cambios excitatorios de la neurotransmisión GABAérgica (Araneda *et al.*, 1994).

El SAG inducido con 6 $\mu$ l a una concentración de 5mM durante 2 horas (3 $\mu$ l/h) genera un aumento en la potencia del EEG (187%) en ambas cortezas cerebrales el día de inducción. El aumento de potencia se registró en la banda de frecuencia de 5 a 15 Hz (Segovia, 2014).

Mediante el análisis del espectro de frecuencia de Wavelets se cuantificó que en la rata macho, el SAG, tiene una duración de 9-10 días y se presentan una frecuencia de descarga de 1.1 espigas/seg (Segovia, 2014). En contraste, la rata hembra el día de inducción presenta un aumento de potencia de un 133%. El SAG induce un perfil ansioso en la rata macho y hembra (Hernández, 2013).

A partir de investigaciones farmacológicas se identificó que el foco epiléptico del SAG, en sus primeras 24 hrs, es resistente a anticonvulsivos de uso clínico (fenitoína, barbitúricos, etosuccimida, valproato, carbamazepina) e incluso al fármaco de elección en casos de *status* epiléptico: el diazepam. La frecuencia de descarga del foco no se modifica significativamente aún empleando dosis anestésicas de pentobarbital (35 mg/Kg; Brailowsky, 1991).

Sin embargo, Segovia, en el 2014 identificó que el HEPP un derivado de la fenil-alquil-amida, es el único medicamento que disminuye significativamente la actividad epileptiforme aguda del SAG. Sus propiedades anticonvulsivas son inmediatas y su efecto además de disminuir la hiperexcitabilidad neuronal del hemisferio instilado, contribuye a una disminución de la actividad epileptiforme

del hemisferio contralateral, inhibiendo de esta manera el proceso de reverberación epiléptica representativa del SAG.

La hiperexcitabilidad neuronal generada por la abstinencia a GABA favorece la inducción, la expresión y el mantenimiento de un fenómeno de plasticidad neuronal denominado: potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés, *Long Term Potentiation*) que representa un modelo y sustrato electrofisiológico de los procesos de memoria. Este fenómeno es un incremento en la eficacia sináptica que se caracteriza por un aumento de la actividad sináptica posterior a una estimulación de alta frecuencia en la vía aferente del sitio en el que se registra. Estos experimentos fueron realizados en la corteza cerebral y en el hipocampo estructuras cerebrales relacionadas directamente con los procesos de aprendizaje y memoria en los mamíferos (Montiel *et al.*, 2000; Casasola *et al.*, 2004).

### **I.3 Memoria**

La memoria es un término amplio que designa una serie de funciones cerebrales diferentes. El rasgo común es la recreación de las experiencias pasadas mediante la activación sincrónica de las neuronas que intervinieron en la experiencia original.

Las características que comparte la memoria implican aprendizaje y reconstrucción total o parcial de una experiencia pasada. El aprendizaje es un proceso en el que las neuronas que se excitan conjuntamente para crear una experiencia concreta se alteran de tal forma que tendrán a re-excitarse al unísono en el futuro. La ulterior excitación conjunta de las neuronas reconstruye la

experiencia original, generando un recuerdo de ésta. El acto de recordar hace más probable que las neuronas implicadas vuelvan a excitarse en el futuro, así que la reconstrucción repetida de un suceso facilita cada vez más su recuerdo.

La memoria es un proceso neurobiológico mediante el cual la información se codifica, almacena y es evocada (Kandel *et al.*, 2000). Las principales estructuras involucradas con la memoria son: hipocampo (transformación de experiencias en recuerdos), tálamo (dirige la atención), amígdala cerebral (genera conductas que potencian atención y activación de varias áreas cerebrales), lóbulo temporal (guarda los conocimientos generales), lóbulo frontal (funciones cerebrales superiores asociadas a memorias), putamen (asociado a habilidades de procedimiento), cuerpos mamilares (memoria episódica), corteza parietal (memorias espaciales), núcleo caudado (asociado con memoria de las destrezas instintivas) y el cerebelo (recuerdos condicionados a eventos vinculados con el tiempo Solís y López-Hernández, 2009).

Con base en su duración o temporalidad la memoria se clasifica en memoria a corto plazo (MCP) y memoria a largo plazo (MLP, Kandel, 2001). La MCP involucra la retención y el almacenamiento de la información durante segundos o minutos. Por medio de un proceso denominado consolidación la MCP se convierte en MLP la cual es una forma de almacenamiento más permanente que puede durar días, semanas o incluso toda la vida (Purves, 2006; Purves, 2007).

El proceso de la formación de la memoria tiene varios estadios naturales, desde la selección inicial y la retención de información hasta la evocación y en ocasiones cambiar o perder el recuerdo. Cada estadio presenta características específicas y aspectos que pueden fallar. 1° Selección: la corteza cerebral está diseñada para almacenar información que le será útil en el futuro y descarta lo que no le funciona. 2° Retención: experiencia seleccionada para que quede memorizada y se almacene de tal modo que se asocia con recuerdos preexistentes pertinentes y se retiene durante un periodo apropiado. 3° Evocación: los acontecimientos actuales deben estimular la evocación de recuerdos apropiados. 4° Cambio: cada vez que se evoca un recuerdo éste se altera ligeramente para dar cabida a una nueva información. 5° Olvido: las experiencias empiezan a olvidarse tan pronto como se han registrado, a menos que se refresquen su recuerdo con regularidad. Todo la información innecesaria se borra (Carter, 2011).

### **I.3.1 Tipos de memoria**

Existen cinco tipos de memoria, cada una con un propósito concreto. La memoria episódica comprende las reconstrucciones de las experiencias pasadas, incluidas sensaciones y emociones, éstas suelen desplegarse como una película y se experimentan del punto de vista de uno mismo. La memoria semántica, es conocimiento factual, autónomo y no personal. La memoria de trabajo es la capacidad de retener información en la mente el tiempo necesario para usarla. La memoria de procedimiento comprende acciones

aprendidas como andar y nadar. La memoria implícita es la de los recuerdos que conservamos sin ser conscientes de ello, y afecta a nuestras acciones de modo sutil: así, puede que una persona nueva nos disguste de modo inexplicable porque nos recuerda a alguien desagradable (Carter, 2011).

### **I.3.2 Neurofisiología de la memoria**

El hipocampo y la corteza cerebral son dos estructuras cerebrales fundamentales para la elaboración de la red de memoria cada uno de los elementos que conforman un recuerdo: visual, sonoro, verbal y emotivo, se codifican en la misma red neuronal que creó ese fragmento. Cuando evocamos una experiencia reactivamos los patrones neurales que se generaron durante la experiencia original que se codificó en la memoria (O' Reilly y Rudy, 2001; Moses *et al.*, 2002).

La excitación sincrónica neuronal hace que las neuronas implicadas tiendan a re-excitarse en el futuro, este fenómeno es conocido como potenciación, recrea la experiencia original. Si las mismas neuronas se excitan juntas a menudo, a la larga se sensibilizarán siempre unas a otras, de manera que cuando una se excite las otras también lo harán. El cual es un fenómeno que depende de la neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica, favorecida por trenes de frecuencia de activación de acetilcolina, activada la atención por dopamina y adrenalina (Siegelbaum, y Kandel, 1991).

La memoria se forma por activaciones estructurales



cerebrales que permiten la actividad neuronal para reconstruirla posteriormente (Carter, 2011). Sólo las experiencias que originan una actividad neural prolongada o intensa quedan codificadas como recuerdos.

### **Recuerdos a largo plazo**

**Atención 0.2 seg:** debido a que el cerebro solo puede analizar una cantidad limitada de información la atención debe circunscribirse en uno solo y extraer la mayor cantidad de información. La atención hace que las neuronas que registran el suceso se exciten con más frecuencia. Esta actividad hace más intensa la experiencia e incrementa la probabilidad de que el evento sea codificado como un recuerdo. A mayor excitabilidad neuronal las conexiones sinápticas son más fuertes, este proceso depende mucho del tálamo y el lóbulo frontal.

**Emoción 0.25 seg:** la experiencia se intensifica con la emoción la información de un estímulo se procesa al principio por diversas vías neuronales que conducen a la amígdala cerebral, por lo tanto se incrementa la atención favoreciendo el almacenamiento de esta en estructuras límbicas.

**Sensación 0.2-0.5 seg:** cuando más intensa es la sensación la probabilidad de que se recuerde la experiencia es mayor, las sensaciones combinan la activación de varias áreas cerebrales para realizar percepciones conscientes prácticamente toda esta información fluye al hipocampo.

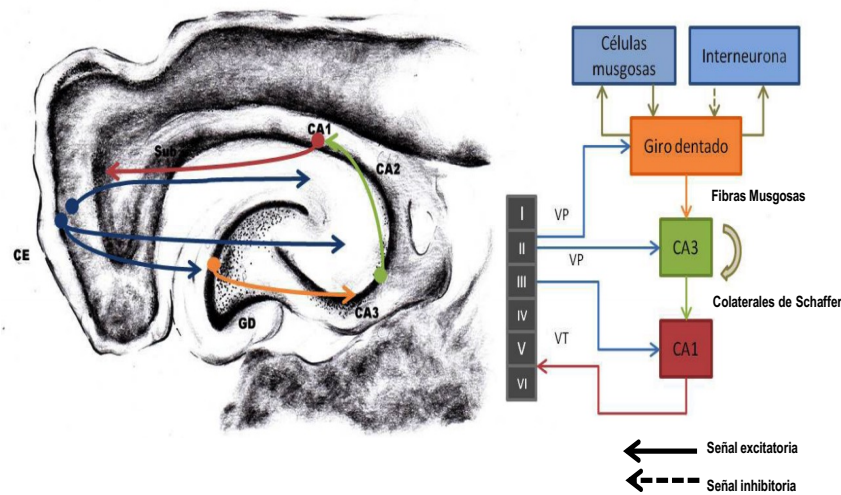
**Memoria de trabajo 0.5 seg-10 min:** la memoria de trabajo activa dos circuitos neuronales para conservar la información que se necesita. Uno para la información viso espacial y el otro para los sonidos. Las rutas de los circuitos abarcan cortezas sensoriales donde se registra la experiencia, y los lóbulos frontales donde se anota conscientemente, la corteza prefrontal controla el flujo de la información.

**Procesamiento hipocampal 10 min- 2 años:** en el hipocampo el procesamiento de la memoria provoca una actividad neural que circula comúnmente en dirección del giro dentado al área CA3 y de ahí al área CA1. La información más intensa se envía y reproduce a las partes del cerebro que registraron primero. Por ejemplo, una imagen regresa a la corteza visual donde se reproduce como un eco del acontecimiento original. De tal manera que el hipocampo es fundamental para que los recuerdos duren toda la vida.

**Consolidación 2 años o más:** en promedio hacen falta dos años para que un recuerdo se consolide en el cerebro humano e incluso el recuerdo puede alterarse o perderse. Durante este tiempo los patrones de excitación neuronal que codifican una experiencia se van recreando entre el hipocampo y la corteza y viceversa. Este diálogo electrofisiológico prolongado y repetitivo hace que el patrón se desplace del hipocampo a la corteza. Y tiene lugar durante el sueño. Por lo que el dormir ayuda a este proceso.

### I.3.3 Hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral localizada en el lóbulo temporal medial y forma parte del sistema límbico, tiene un papel fundamental en los procesos de la memoria y el aprendizaje (O' Reilly y Rudy, 2001). Anatómicamente, está organizado en varias regiones: Giro Dentado (GD) formado en su mayoría por células granulares y áreas: CA1, CA2 y CA3 constituidas por neuronas piramidales e interneuronas (Figura 3).



**Figura 3. Esquema de los circuitos del hipocampo adulto.** La tradicional vía excitatoria trisináptica (Corteza entorrinal (CE), Giro Dentado (GD)-CA3-CA1-CE) es descrita por las flechas de colores (flecha azul: vía perforante VP; flecha naranja; vía de las fibras musgosas; flecha verde; colaterales de Schaffer; flecha roja; proyecciones de CA1 a CE. (Imagen modificada de Olivares, Juárez y García, 2015).

El circuito trisináptico hipocampal inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal (CE). Las neuronas de la CE envían sus proyecciones hacia las células granulares del GD. Las células granulares a su vez proyectan un haz de fibras musgosas (FM) hacia las células piramidales del área CA3, las cuales finalmente envían sus axones hacia las neuronas piramidales de CA1 mediante las colaterales de Schaffer. La aferencia de esta vía es que el hipocampo envía información a varias estructuras cerebrales a partir del área CA1 (Balderas, Ramírez-Amaya, Bermudez-Rattoni, 2004).

Las interneuronas GABAérgicas del hipocampo son fundamentales para la modulación de la memoria y muchas funciones de esta estructura. Sin la modulación GABAérgica del hipocampo no podría priorizarse la entrada de un estímulo e inhibir los estímulos de poca importancia: las neuronas GABAérgicas son fundamentales para el filtro de información en el hipocampo. Se sabe que agonistas GABAérgicos disminuyen la función de la memoria y sus antagonistas mejoran su consolidación (McGaugh y Roozendaal, 2009). Estudios farmacológicos han demostrado que la bicuculina genera una mejora en la memoria cuando se infunde en el área CA1 del hipocampo inmediatamente o 1.5 h después del entrenamiento (Luft *et al.*, 2004). Kim *et al.*, (2012) demostraron que la administración de bicuculina en el área CA1 del hipocampo administrada 1h después de la prueba de evitación pasiva mejora la consolidación de la memoria, aumentando de manera significativa los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Concluyendo que existe una ventana de tiempo posterior a la

formación de la memoria para mejorar la consolidación y que el incremento de los niveles de BDNF está relacionado directamente con una mejora de la consolidación.

Inyecciones de muscimol en el hipocampo, disminuyen la recuperación de la memoria en la prueba del laberinto acuático de Morris (Moser y Moser, 1998). de Lima et al, (2006) demostró que una inyección de muscimol en el hipocampo después de un entrenamiento deteriora la memoria a corto plazo en la prueba de memoria de reconocimiento de objetos.

Las redes neuronales en sincronía favorecen la adquisición de la memoria. Por lo tanto esta tesis propone que el incremento de la actividad neuronal del SAG por sus cambios sinápticos, asemeja los efectos epileptiformes de la bicuculina, por lo que se sugiere que la hiperexcitabilidad neuronal del SAG puede tener modificaciones en los mecanismos de duración y temporalidad de la memoria. El presente trabajo pretende realizar el contraste del efecto sobre la memoria de reconocimiento de una hiperexcitabilidad neuronal en la corteza cerebral con respecto a una del área CA1 del hipocampo.

#### **I.3.4 Memoria de Reconocimiento**

La memoria de reconocimiento se ha definido como la capacidad de saber que algo se ha experimentado previamente, desde estímulos individuales hasta todo un evento (Mandler, 1980; Brown y Aggleton, 2001). Dentro del proceso de reconocimiento se han identificado dos componentes. El primero es la familiaridad el cual da la capacidad de saber que un estímulo se ha presentado con

anterioridad pero no el recuerdo de un episodio específico, y el segundo es el recuerdo que está basado en la información contextual así sea espacial o temporal de los eventos, es decir cuándo y dónde se experimentaron los estímulos (Yonelinas, 2002).

Se ha demostrado que diferentes estructuras cerebrales como: la corteza entorrinal, la corteza perirrinal, la corteza insular y el hipocampo que forman parte del lóbulo temporal medial participan de manera diferencial en la memoria de reconocimiento (Murray y Richmond, 2001). Diferentes estudios han mostrado que el hipocampo está involucrado en la memoria contextual, codificando información sobre la posición en el espacio, lo cual sugiere que el hipocampo es una estructura que está involucrada en la memoria de reconocimiento dentro de un contexto, pero no en la memoria de reconocimiento (Mumby *et al.*, 2005; Winters *et al.*, 2004; Eichenbaum, Yonelinas y Ranganath, 2007; Balderas *et al.*, 2008).

Una de las pruebas que cuantifica la memoria de reconocimiento mediante la cual se puede identificar la correlación conductual a nivel del procesamiento y almacenamiento de la información es la prueba de memoria de reconocimiento de objetos, la cual fue propuesta, estandarizada y validada en ratas por Ennaceur y Delacour (1998) está basada en la tendencia natural de los roedores por preferir estímulos novedosos sobre los familiares. La prueba consiste en introducir al animal en una caja experimental en la cual se encuentran dos objetos idénticos durante un tiempo determinado. Posteriormente se les coloca de nuevo en la misma

caja, pero esta vez con un objeto anteriormente presentado llamado familiar y un nuevo objeto llamado novedoso.

La tendencia natural de los roedores es explorar por más tiempo un objeto novedoso que uno que fue explorado previamente. Es importante destacar que esta prueba es un modelo análogo a pruebas utilizadas en humanos que cuantifican la memoria de reconocimiento, en las cuales se evalúa el material verbal: palabras, frases e historias y material no verbal: imágenes, objetos, fotografías y series de líneas y puntos. Además estas pruebas se han utilizado ampliamente para evaluar y caracterizar síndromes amnésicos (Reed y Squire, 1997).

#### **I.4 Ansiedad**

La ansiedad es una respuesta fisiológica (activación vegetativa) esencial. Con alteraciones cognitivas conductuales, cuyo estímulo provocador es difuso y subjetivamente peligroso. Su respuesta es generalizada y duradera. La ansiedad es necesaria para la supervivencia bajo condiciones ambientales cambiantes, no obstante, la ansiedad generalizada persistente y exagerada son manifestaciones patológicas que disminuyen la calidad de vida (Norholm y Ressler, 2009). Aproximadamente el 30% de la población experimenta síntomas relacionados con la ansiedad en su vida (Kessler *et al.*, 2005 ). Se sabe que la ansiedad clínicamente es la manifestación de la conducta de miedo que se caracteriza por un estado de alerta continua ante el peligro (Möhler, 2012).

La neurotransmisión GABAérgica ha sido implicada en la patogénesis y tratamiento de la ansiedad, se ha descrito que los moduladores alostéricos positivos del receptor GABA<sub>A</sub> tienen efectos ansiolíticos mientras los moduladores alostéricos negativos producen efectos ansiogénicos (Nash y Nutt, 2007; Sandford, Argyropoulos y Nutt, 2000; Argyropoulos, Sandford y Nutt, 2000). La caracterización de los estados de ansiedad en los seres humanos presenta una conducta de evitación del daño y una polarización de las señales de amenaza (Crestani *et al.*, 1999).

Se ha demostrado mediante estudios clínicos y en animales que disfunciones pre y postsinápticas en la transmisión GABAérgica pueden ser la causa de trastornos ansiosos y del estado de ánimo (Luscher *et al.*, 2011; Smith y Rudolph, 2012; Möhler, 2012).

A partir de investigaciones con técnicas en neuroimagen: tomografía computarizada y tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes con trastorno de pánico se cuantificaron e identificaron déficits en los niveles de receptores GABA<sub>A</sub> en el hipocampo, en la corteza orbitofrontal y parahipocampal (Abadie *et al.*, 1999). Ratones *knock-out*, de la subunidad  $\gamma 2$ , del receptor GABA<sub>A</sub> aumentaron el comportamiento relacionado a conductas ansiosas, lo que sugiere que una disfunción en la subunidad  $\gamma 2$  predispone a la ansiedad (Crestani *et al.*, 1999).

Estudios neuroquímicos han demostrado que modificaciones en el receptor GABA<sub>A</sub> pueden desencadenar trastornos de ansiedad en humanos. Clínicamente las alteraciones en la neurotransmisión



GABAérgica dan como resultado síntomas ansiosos (Crestani *et al.*, 1999; Millan, 2003; Rudolph y Möhler, 2004).

Diversos estudios han demostrado que existe una correlación no lineal entre la ansiedad y la memoria (Wall y Messier, 2000; Maren y Quirk, 2004; Kalueff *et al.*, 1997; Kalueff, 2007) lo que sugiere que ambos dominios pueden afectarse de manera independiente. Modulaciones en la actividad GABAérgica está correlacionado con conductas tipo ansiosas, por lo que es posible que al inducir hiperexcitabilidad neuronal en dos áreas cerebrales: corteza cerebral y el área CA1 del hipocampo, se cuantifiquen las diferencias en la manifestación de la ansiedad.

## **II. Justificación**

La neurotransmisión GABAérgica está implicada en diferentes trastornos neuropsiquiátricos, además de regular diferentes conductas, es parte fundamental del equilibrio de la excitabilidad neuronal. La participación del GABA tiene consecuencias directas para la formación de redes neuronales y plasticidad neuronal, desempeñando un papel importante en la memoria y el aprendizaje. La hiperexcitabilidad neuronal generada por la inducción de la abstinencia a GABA comprende un modelo validado EEG y conductualmente que es análogo a la sintomatología de las abstinencias a diversas drogas GABAérgicas. Esta tesis identifica por primera vez la correlación electrofisiológica y conductual de la abstinencia a GABA con la memoria y la disociación en dos distintas áreas cerebrales en un aspecto de la plasticidad neuronal y esto puede ser una diana terapéutica para el manejo de las abstinencias a drogas GABAérgicas. Nuestros resultados proponen estandarizar y cuantificar las diferencias de la hiperexcitabilidad neuronal por abstinencia a GABA en una estructura cortical y otra límbica.

Se pretende identificar las diferencias electrofisiológicas y modificaciones en la memoria a corto y largo plazo de la abstinencia a GABA en la corteza cerebral y área CA1 del hipocampo, además si la hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia genera un perfil tipo ansioso.

### **III. Objetivos**

#### **General**

Identificar las diferencias electrofisiológicas y conductuales entre el SAG del hipocampo y el SAG de la corteza cerebral inducido en ratas macho de la cepa Wistar.

#### **Específicos**

Analizar diferencias y similitudes del número de complejos espiga-onda y potencia de la actividad electroencefalográfica característica del SAG inducido en la corteza cerebral somatomotora, e hipocampo.

Cuantificar los índices de reconocimiento (IR) en la memoria de corto y largo plazo en el SAG H y el SAG Cx.

Cuantificar las diferencias en la conducta tipo ansiosa inducida por la interrupción abrupta de la instilación en la corteza cerebral o el área CA1 del Hipocampo, mediante el número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y brazos cerrados en el Laberinto Elevado en Cruz (LEC), posterior a la inducción del SAG.

## **Variables de trabajo de la presente tesis**

### **1) Variable Independiente (SAG H)**

- Retiro abrupto de la instilación intrahipocampal de GABA en el área CA1 del hipocampo derecho para inducir el Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG).

### **2) Variables Dependientes**

- Incremento de la excitabilidad neuronal en la actividad electroencefalográfica en ratas macho.

- Cambios en la memoria a corto y largo plazo, mediante la cuantificación de un índice de la prueba de reconocimiento de objetos

- Modificación de la conducta tipo ansiosa, evaluada en el LEC mediante el número de entradas y porcentaje en tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados.

### **1) Variable Independiente (SAG Cx)**

- Retiro abrupto de la instilación intracortical de GABA en la corteza somatomotora derecha para inducir un SAG cortical.

### **2) Variables Dependientes**

- Cambios de la excitabilidad neuronal en el EEG cuantificado por la potencia y en el número de complejos espiga-onda característicos del SAG.

- Tiempo de exploración por objeto cuantificado por un índice

de reconocimiento (análisis de latencia y duración) definido como la cantidad de tiempo que pasa en un objeto, dividido entre la exploración total.

- Tiempo de permanencia en brazos abiertos y cerrados y número de entradas en el LEC.

### **Hipótesis General**

Si se realiza un retiro abrupto de la instilación de GABA en el área CA1 del hipocampo derecho o la corteza cerebral somatomotora derecha en ratas macho, entonces habrá un incremento de la excitabilidad neuronal y está generará cambios en la memoria de reconocimiento y en la conducta de ansiedad.

### **Hipótesis específicas**

1. Si se interrumpe abruptamente la instilación de GABA (en la corteza cerebral o en el área CA1 del hipocampo) generará modificaciones electroencefalográficas tendientes a un incremento en la actividad neuronal.
2. El SAG H tendrá mayor potencia EEG, actividad epileptiforme y propagación que el expresado en la corteza cerebral.
3. El SAG Cx y el SAG H modificará el desempeño en la prueba de reconocimiento de objetos, cuantificado mediante un índice de reconocimiento.
4. La interrupción abrupta de la instilación intracortical e intrahipocampal de GABA inducirá un perfil tipo ansioso en la rata, cuantificado por un aumento en el tiempo de permanencia y número de entradas a brazos cerrados en el LEC.

#### **IV. Material y Método**

##### **Sujetos experimentales**

Se utilizaron 110 ratas macho de la cepa Wistar (250-300g), proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRF), las cuales se mantuvieron en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25°C), agua y alimento *ad libitum*, con ciclo de luz oscuridad invertido 12:12 hrs y de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de animales del laboratorio de la Academia Nacional de Medicina (1999, y la norma oficial de la SAGARPA y aprobados por el comité de ética del INPRF). En todos los procedimientos experimentales se evitó cualquier daño o sufrimiento innecesario de los animales. Los sujetos de experimentación fueron alojados en cajas individuales de acrílico transparentes, y permanecieron así hasta el final del procedimiento. Cada uno de los experimentos se realizó durante el ciclo de oscuridad de las ratas macho.

##### **Sustancias utilizadas en esta investigación**

Para la colocación del complejo cánula/electrodo conector se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (Pisabetal® 50 mg/Kg, México) diluido con cloruro de Sodio (J.T Baker®, USA). Como anestésico local se usó xylocaína® (AstraZeneca S.A de C.V solución inyectable al 2% /50ml).

Para disminuir la posibilidad de infección, se utilizaron; (bencilpenicilina benzatinica, Amsa Laboratorios® antibióticos de

México, S.A. de C.V, aplicación única). Antiséptico con base en iodo povidona (Quiromed® 0.8%, México), antiséptico (Microdacyn®, Oculus Technologies de México), peróxido de hidrógeno (J.T Baker®, USA) y cloruro de benzalconio (Antibenzil®, México).

Para inducir la hiperexcitabilidad: retiro abrupto de instilación intracortical de GABA (Sigma-Aldrich®, St Lois, MO U.S.A) en la corteza somatomotora derecha, o el área CA1 del hipocampo se utilizó dosis de 5 mM; 6 µl/2h.

## **Procedimientos**

### **Cirugía Estereotáxica**

Para la implantación del complejo cánula/electrodo conector se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (30 mg/Kg, i.p.). Se aplicó lidocaína (0.1 ml) en cada conducto auditivo y se colocó a la rata en un sistema estereotáxico de una torre (Neuroscience Physiology Research Equipment Stoelting modelo Lab. Standard®), después se esterilizó la zona con isodine y se inyectó lidocaína (0.6 ml, sc) en el cuero cabelludo para realizar un corte en la piel. De acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998) se colocaron dos cánulas (Aguja BD Precision Needle®, 23mm x 25mm) de infusión intracortical a 1.5 mm de profundidad, 2 mm posterior a bregma y a 2.5 mm de la línea media para obtener la señal electroencefalográfica de la corteza somatomotora derecha, para el área CA1 del hipocampo las coordenadas fueron: 3 mm de profundidad, 2 mm posterior a bregma y a 2.5 mm de la línea media.



Asimismo, se colocaron 3 electrodos de registro en el cráneo (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre, dos de registro colocados a 4 mm posterior a bregma y uno de referencia sin actividad anterior a bregma) para obtener la señal EEG de la capa superficial de la corteza cerebral. Las cánulas y los tres electrodos se soldaron a un conector mediante un Cautín Steren® y estaño para soldar, posteriormente se fijaron al cráneo con resina acrílica y monómero (Nic Tone Cross Linked®, mdc dental México). Todos los instrumentos de cirugía fueron esterilizados previamente con un Horno esterilizador CRAEdental®. Con el fin de asegurar la permeabilidad de las cánulas se les introdujo una “guía removible”. Al término de la cirugía se les administró antibiótico de forma profiláctica. Los animales permanecieron una semana en reposo antes de cualquier manipulación.

### **Registro electroencefalográfico (EEG)**

El registro de la actividad electroencefalográfica se realizó en un cuarto aislado faradizado, la señal fue adquirida con un cable de registro (5 terminales faradizadas) adaptado a conexión directa con amplificadores (P511 AC amplifier GRASS Astro Med In.) La amplificación fue de 20, con filtros de baja frecuencia (3 Hz/1000) y alta frecuencia (0.3 KHz). Para la traducción de esta señal se utilizó el software Poliview 8 (National Instruments). Los registros tuvieron una duración de dos horas en los animales en los que se les indujo la abstinencia. Todos los registros EEG tuvieron una duración de 30 min. Los datos electrofisiológicos se analizaron con el Software

Adq4ch mediante el uso de filtros digitales de 0-40 Hz y eliminación de saturación. Se obtuvo el valor de la potencia total del EEG ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ) en la banda de frecuencia de 4-20 Hz a partir del espectro de frecuencia de Wavelets.

El conteo de espigas se realizó mediante la identificación de las primeras 10 espigas representativas en el registro EEG después del inicio del SAG. Posteriormente se promediaron los valores obtenidos para establecer una frecuencia de disparo.

### **Inducción del Síndrome de Abstinencia a GABA (SAG)**

Para la inducción de la abstinencia a GABA se realizó la instilación intracortical o intrahipocampal de GABA (5mM) en la corteza somatomotora derecha o en el área CA1 del hipocampo, mediante una bomba de instilación programable (Kd Scientific®), una microjeringa (Hamilton Co. Reno). Se instiló a una velocidad de 3  $\mu\text{l}$  por hora, durante 2 h. Inmediatamente después de la interrupción de la instilación se registró la actividad electroencefalográfica para evaluar los cambios en la excitabilidad neuronal durante 2 h.

### **Prueba del laberinto elevado en cruz (LEC)**

Para la cuantificación de la ansiedad se utilizó LEC, el cual es una estructura de madera en cruz, elevada a 50 cm del piso con 4 brazos: un par con paredes de 40 cm de alto denominados brazos cerrados (BC) de 50 x 10 cm cada uno y otro par con las mismas dimensiones llamados brazos abiertos (BA). Los cuatro brazos se encuentran unidos por un cuadro central de 10 x 10 cm. El cuarto

donde se realiza la prueba debe estar iluminado con luz roja (40W).

Para la evaluación de la ansiedad se colocó a la rata en el centro del LEC con la cabeza hacia uno de los BA y se le dejó explorar libremente el LEC durante 5 min. Se evaluó: 1) el número de entradas a BA y BC; así como 2) el porcentaje de tiempo en cada uno de los brazos. El criterio para considerar una entrada es que la rata cruce con las cuatro patas hacia el interior de los mismos.

En este paradigma un incremento en el tiempo de permanencia y el número de entradas a BC es interpretado como la respuesta de tipo ansiosa, mientras que el número total de entradas a ambos brazos proporciona una medida de la actividad general (Fernández- Guasti y Picazo, 1999; Pellow et al., 1985). La prueba fue registrada mediante el uso de una cámara de video (Sony HandycamMod DCR SX40) adaptada a una tarjeta digital de PC para almacenar los videos en una computadora PC (HP/compac 6000; software ENLTV).

### **Prueba de Reconocimiento de Objetos**

Se utilizaron cajas de madera de color gris (cuyas medidas fueron 40X40X60 cm) con el piso cubierto de aserrín y colocadas en un cuarto separado del bioterio. Todas las sesiones fueron videograbadas con una cámara de video (Steren SEG-3000) adaptada a una tarjeta digital de PC para almacenar los videos en una computadora PC (HP/compac 6000; software ENLTV). Todas las cajas se mantuvieron en el mismo cuarto experimental, con las mismas condiciones de luz y temperatura. Los objetos a reconocer

fueron focos blancos (6cm de diámetro y 5 cm de largo), frascos transparentes de vidrio (5.5-cm diámetro y 5-cm alto). Todos los objetos fueron fijados al piso con velcro para evitar que fueran desplazados por los animales, fueron colocados en las esquinas traseras de la caja, a una distancia de 10 cm de las paredes. Cuando los objetos fueron presentados más de una vez al animal, se utilizaron copias idénticas para evitar que el reconocimiento de los objetos no fuera por la presentación del objeto. Para evitar señales olfativas en cada ensayo el aserrín de la caja fue removido y los objetos se limpiaron minuciosamente con etanol al 70%.

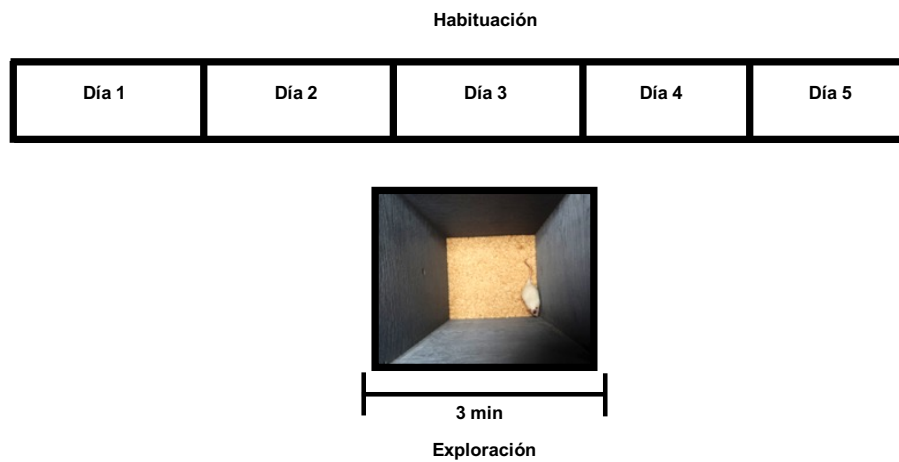
### **Procedimiento Conductual**

Posterior a la cirugía, todos los animales tuvieron una semana de recuperación antes de cualquier procedimiento conductual. En cada ensayo los animales fueron llevados al cuarto experimental 2 horas antes del inicio de cada sesión y 2 horas después de la sesión para evitar condiciones de estrés que afectarán la ejecución de la tarea, así como la consolidación de la misma. Durante todas las fases, la rata se introdujo a la caja mirando hacia la pared opuesta al lugar donde se colocaron los objetos, para evitar inducir alguna tendencia hacia alguno de los objetos.

### **Habitación**

Todos los animales tuvieron una fase de habituación durante 5 días antes de cada experimento, que consistió en la manipulación de la rata durante un minuto en el regazo del experimentador. De inmediato se introdujo a la caja sin objetos por 3 minutos. Al finalizar

la exploración, los animales fueron manipulados durante otro minuto y regresados a su caja individual (Fig. 4).



**Figura 4.** Esquema del protocolo conductual de habituación para la tarea de reconocimiento de objetos. Durante un minuto se manipuló a la rata en el regazo del experimentador inmediatamente después, se colocó en la caja y se le permitió explorar libremente. Durante 5 días consecutivos se llevó a cabo este procedimiento con duración de tres minutos en cada ensayo.

## **Tarea de Reconocimiento de Objetos**

### **Fase de muestra**

En la fase de muestra, las ratas se colocaron en la caja mirando hacia la pared opuesta para evitar inducir alguna tendencia de atención hacia alguno de los objetos, donde previamente se habían colocado dos objetos idénticos (A1 y A2), durante 10 minutos se les permitió explorar libremente los objetos. Al finalizar el tiempo de exploración el animal fue regresado a su caja individual.

### Prueba de memoria

La prueba de memoria de corto plazo se realizó 15 min después de la instilación, o 24 h después (memoria de largo plazo). En cada ensayo se les permitió explorar libremente una copia idéntica del objeto previamente presentado (familiar, A3) y un nuevo objeto (B1) durante 3 minutos (Fig. 5).

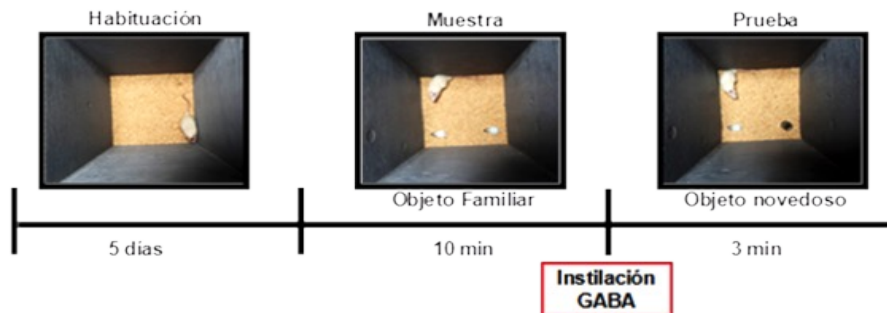


Figura 5. Después de 5 días de habituación se realizó la fase de muestra, en la cual se introdujo a la rata en la caja con dos objetos idénticos (A1 A2) durante 10 min. Al finalizar se realizó la Instilación de GABA. La prueba de memoria a corto plazo se realizó 15 min post instilación y 24 h después la de largo plazo.

### Análisis de resultados de memoria

Se analizó la conducta de exploración mediante la cuantificación de un índice de reconocimiento (IR) definido como la cantidad de tiempo total de exploración del objeto novedoso dividido entre la cantidad de tiempo total de ambos objetos (tiempo de exploración del objeto novedoso / tiempo de exploración del objeto familiar + tiempo de exploración del objeto novedoso). Un IR de 0.5 expresa que no hay preferencia de un objeto sobre otro, mientras

que un IR mayor de 0.5 represente la preferencia por alguno de los objetos.

### **Análisis Estadístico**

Los resultados están expresados en medias y error estándar (EE). Para la cuantificación de los resultados, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para cada una de las variables dependientes, con una significancia de  $p \leq 0.05$ , seguida de una prueba *Post Hoc* de Dunette por medio de los paquetes estadísticos GraphPad y SigmaPlot 11.0.

Mediante el análisis de frecuencia de Wavelets, se cuantificaron el número de complejos espiga onda, la potencia y frecuencia de los resultados electroencefalográficos. La evaluación estadística se realizó mediante un análisis de varianza de un factor haciendo una comparación intra y entre grupos con un valor de  $p \leq 0.05$  (ANOVA *Post Hoc*: Tukey).

La evolución electrofisiológica fue considerada como un estudio longitudinal donde se cuantificaron los complejos espiga-onda, el aumento de amplitud y donde se evaluaron las diferencias electrofisiológicas entre las cortezas somatomotoras y los hipocampos, los que recibieron la instilación intracortical o hipocampal de GABA con respecto al área contralateral (ANOVA, *Post Hoc*: Tukey).

En la prueba del LEC, los datos cuantificados están cuantificados en proporción, tanto en número de entradas, así como porcentaje de tiempo siguiendo esta ecuación:

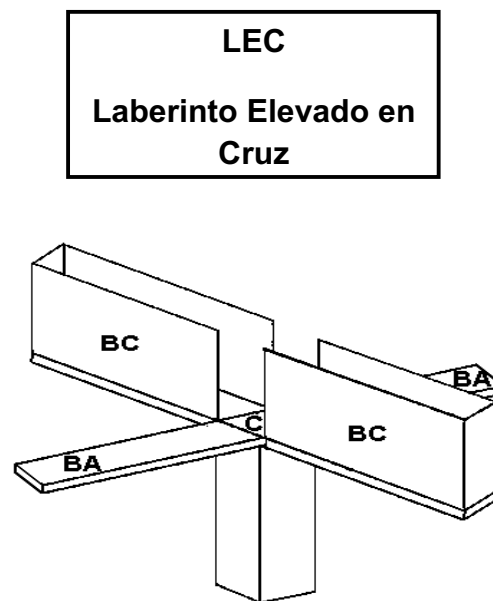
$$t Bx t Bx + t Bx \times 100$$

Donde  $t$  es el tiempo y  $x$  es el brazo en el que ha permanecido, se usó la misma ecuación para el número de entradas. Los resultados conductuales fueron analizados con una ANOVA, *Post Hoc*: Tukey.

### Procedimiento Experimental

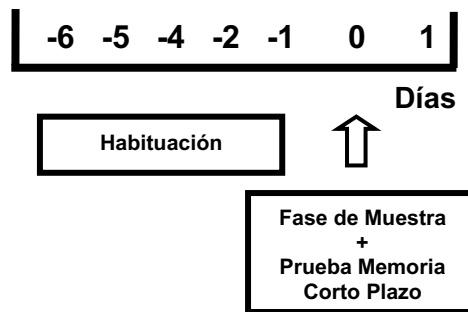
Cada condición experimental contó con ratas asignadas aleatoriamente en uno de 11 grupos. La  $n$  de cada uno de los grupos fue de 10 ratas.

**Grupo 1. Control:** se realizó con la finalidad de ser el punto de comparación de las modificaciones en los niveles de la conducta de ansiedad para el resto de los grupos. Se utilizaron 10 ratas macho a las cuales se les realizó la prueba del LEC.

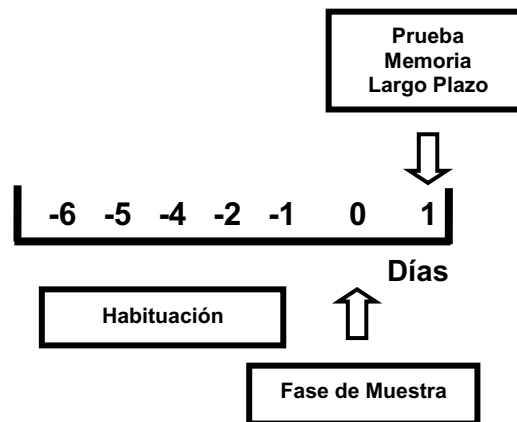




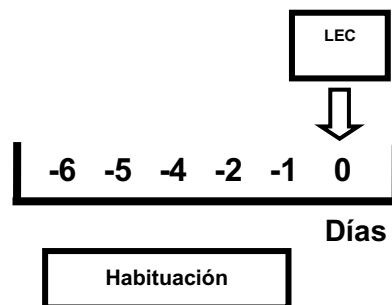
**Grupo 2. Control de memoria a corto plazo:** tuvo como objetivo ser el punto de comparación para la evaluación de las modificaciones de la memoria a corto plazo con los grupos de evaluación experimental de la abstinencia a GABA en la corteza cerebral e hipocampo, de la prueba de reconocimientos de los objetos. Todos los animales tuvieron 5 días de habituación y su respectiva prueba.



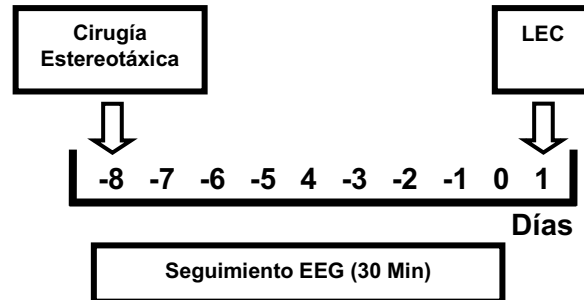
**Grupo 3. Control de memoria a largo plazo:** el propósito de este grupo fue identificar los IR en condiciones basales de la memoria a largo plazo de la prueba de reconocimiento de objetos y cuantificar las modificaciones con los grupos; SAG Cx y SAG H. Todos los animales tuvieron 5 días de habituación y su prueba de evaluación.



**Grupo 4. SHAM Memoria:** para evaluar si la prueba de memoria de reconocimiento de objetos induce cambios en la conducta de ansiedad, la cual fue cuantificada mediante la prueba de LEC. Todos los animales tuvieron el mismo protocolo; 5 días de habituación y su respectiva prueba conductual.



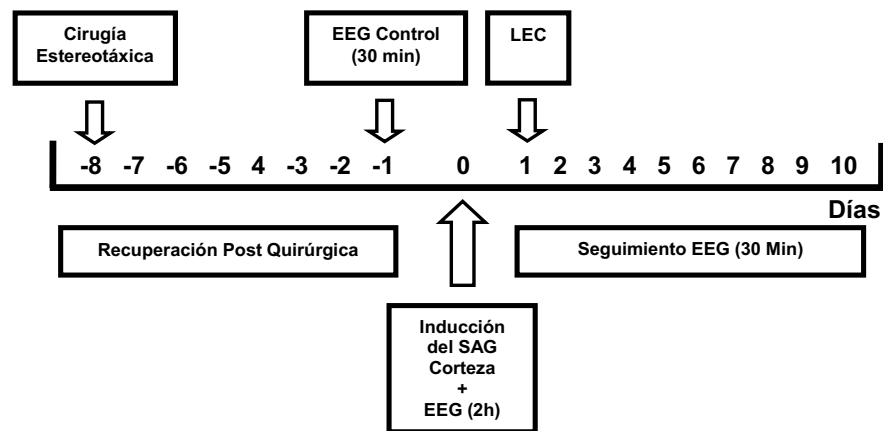
**Grupo 5. SHAM:** se realizó para determinar si la cirugía estereotáxica inducía cambios en la conducta motora y exploratoria de las ratas. Se utilizaron 10 ratas macho que fueron implantadas para la colocación del complejo cánulas-electrodos. Los animales tuvieron 7 días para la recuperación de la intervención quirúrgica y al día siguiente se evaluó la conducta de ansiedad mediante la prueba de LEC.



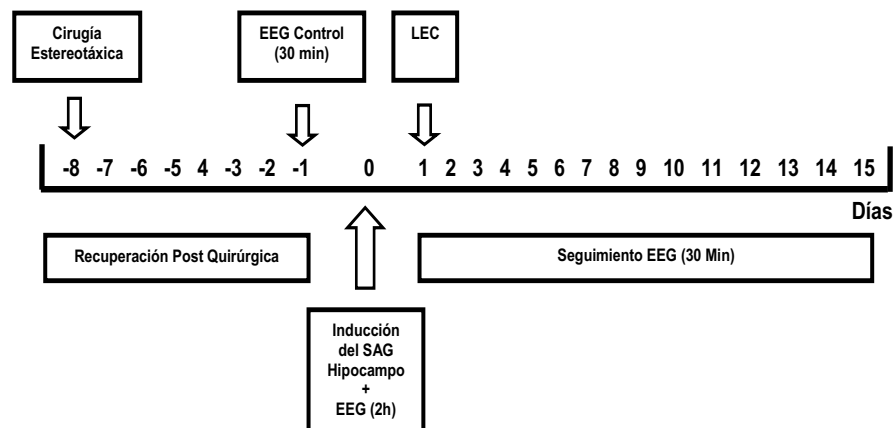
Todos los grupos tuvieron una semana de recuperación posterior a la cirugía estereotáxica, siete días después de la cirugía se realizó un registro electroencefalográfico con duración de 30 min con el objetivo de cuantificar datos basales de la actividad EEG. Todos los grupos fueron evaluados para identificar la conducta de ansiedad mediante el LEC.

**Grupo 6. SAG Cx:** con el objetivo de replicar y estandarizar la señal electroencefalográfica del SAG de la corteza cerebral se indujo el SAG en la corteza somatomotora derecha (n = 10). Durante las primeras dos horas post instilación se realizó un registro EEG y se hizo un seguimiento de registrar el EEG 10 durante días.

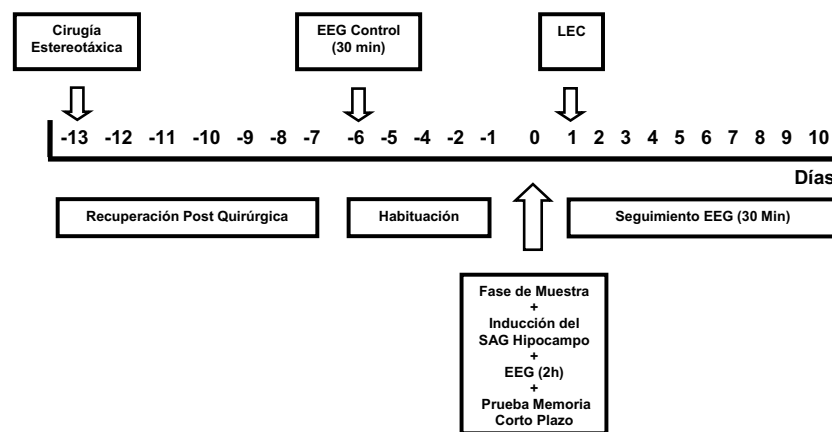
Se cuantificaron los cambios en la potencia, la frecuencia y el número de complejos espiga onda del EEG del SAG de la corteza cerebral.



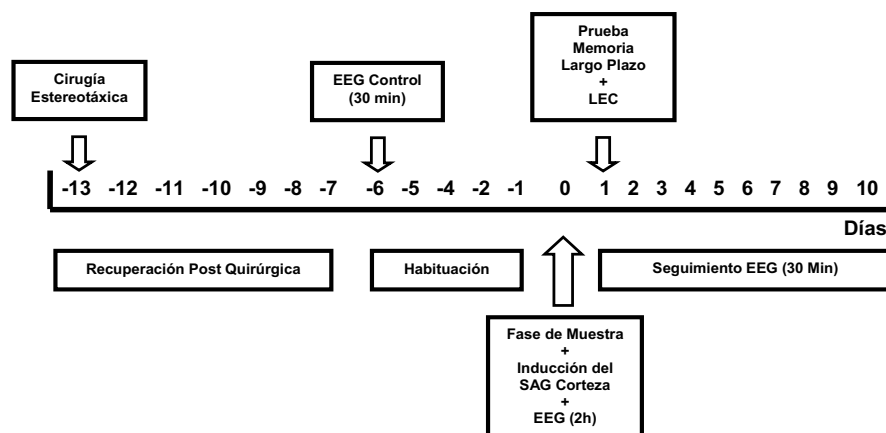
**Grupo 7. SAG H:** para estandarizar por primera vez la señal electroencefalográfica del SAG del hipocampo en el área CA1. Se realizó la instilación de GABA (5mM; 6  $\mu$ l/2h) en el área CA1 del hipocampo derecho (n = 10). Inmediatamente después se realizó un registro EEG durante 2h y un seguimiento de 15 días con duración de 30 min. Se cuantificaron los cambios en la potencia, la frecuencia y el número de complejos espiga onda.



**Grupo 8. Memoria a Corto Plazo/SAG Cx:** se realizó para evaluar si la hiperexcitabilidad neuronal generada por la inducción del SAG en la corteza somatomotora derecha en ratas macho modificaría la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo. Todos los animales tuvieron 5 días de habituación antes de cada fase de la prueba de reconocimiento de objetos. El día 6 se realizó la instilación de GABA (5mM; 6  $\mu$ l/2h) 30 min después de la instilación se realizó la evaluación a corto plazo. Se cuantificó un IR para evaluar si existían modificaciones en la memoria de reconocimiento de objetos.

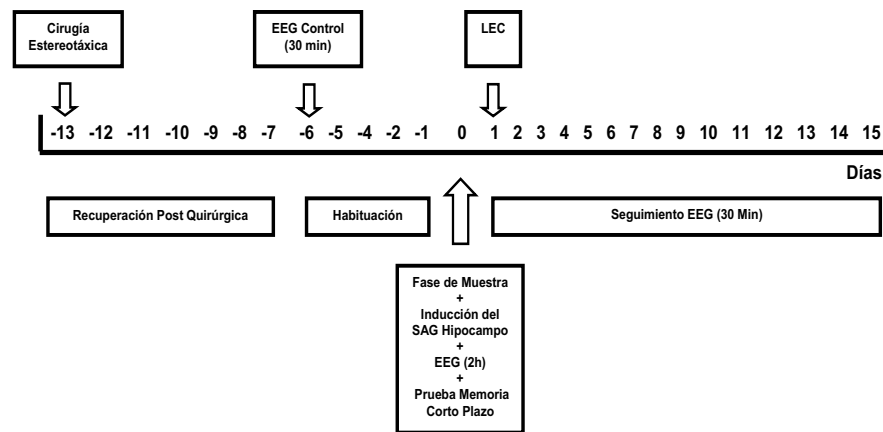


**Grupo 9. Memoria a Largo Plazo /SAG Cx:** nos permitió saber si la inducción del SAG Cx en ratas macho modificaría la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo. Todos los animales tuvieron 5 días de habituación antes de cada fase de la prueba de reconocimiento de objetos. El día 6 se realizó la instilación de GABA (5mM; 6  $\mu$ l/2h) y al día siguiente se evaluó la memoria a largo plazo. Por medio del IR se cuantificaron las modificaciones de la memoria a largo plazo.

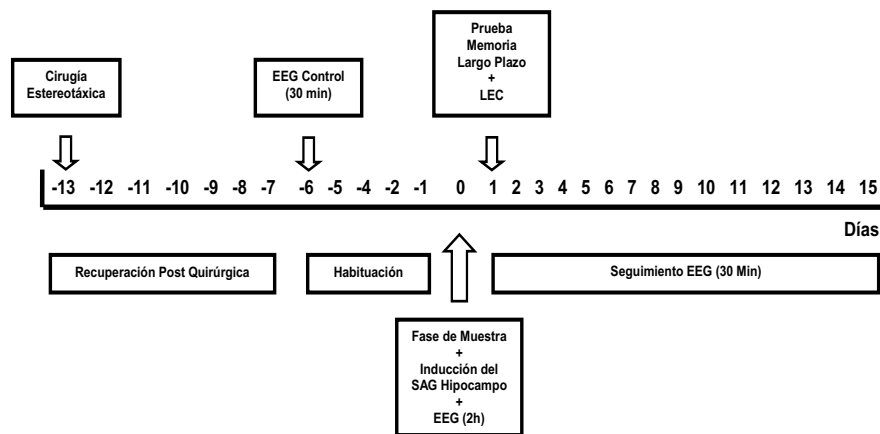




**Grupo 10. Memoria a Corto Plazo /SAG H:** con el objetivo de evaluar si la hiperexcitabilidad neuronal generada por la inducción del SAG del área CA1 del hipocampo derecho en ratas macho modificaría la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo. Los animales tuvieron 5 días de habituación antes de cada fase de la prueba de reconocimiento de objetos. El día 6 se realizó la instilación de GABA (5mM; 6  $\mu$ l/2h) y 30 min después de la instilación se realizó la evaluación a corto plazo. Se cuantificó un índice de reconocimiento para evaluar si existían modificaciones en la memoria de reconocimiento de objetos.



**Grupo 11 Memoria a Largo Plazo /SAG H:** este grupo identificó si la inducción del SAG en el área CA1 del hipocampo derecho en ratas macho modificaría la memoria de reconocimiento de objetos a largo plazo, y si estas modificaciones presentaban diferencias significativas al realizar una comparación con los grupos de corteza cerebral. Los animales fueron habituados durante 5 días antes de cada fase de la prueba de reconocimiento de objetos. El día 6 se realizó la instilación de GABA (5mM; 6  $\mu$ l/2h) el día siguiente se realizó la evaluación de la memoria a largo plazo. Se cuantificó un índice de reconocimiento para evaluar si existían las modificaciones en la memoria de reconocimiento de objetos.



## **V. Resultados**

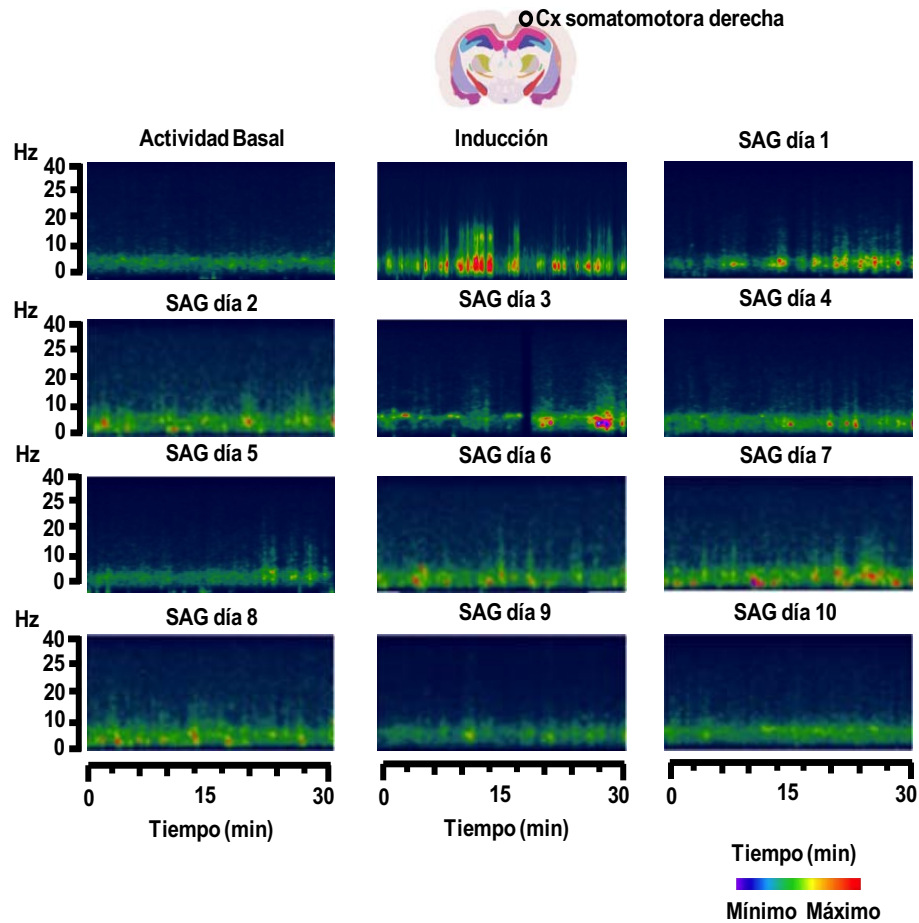
### **Análisis Electrofisiológico del SAG de la corteza cerebral**

El primer planteamiento de esta tesis fue realizar un análisis electrofisiológico que identificará las diferencias electrofisiológicas de la hiperexcitabilidad neuronal inducida por el SAG de la corteza cerebral en relación a un SAG del hipocampo. Se cuantificó el número de complejos espiga-onda, frecuencia y la potencia de la actividad electrofisiológica. El análisis de Wavelets nos permitió realizar una medición electrofisiológica de la evolución temporal del SAG en distintas bandas de frecuencia de la señal EEG.

En la Fig. 6. se muestra el desarrollo cuantitativo del SAG Cx que presenta el EEG antes, durante y después de la instilación de GABA en la corteza cerebral somatomotora derecha.

El SAG de la corteza cerebral se manifiesta de manera electrofisiológica por un incremento de la potencia en la banda de frecuencia de 4-20 Hz, y aparición de complejos espiga-onda los cuales disminuyen en su amplitud y frecuencia de manera gradual en la evolución temporal de la abstinencia hasta el día 10 post inducción. El aumento en la potencia se observa por la aparición de colores rojos-amarillos en el análisis de Wavelets que representa la hiperexcitabilidad neuronal (Fig. 6).

## SAG en la corteza cerebral



**Figura 6. Espectros de frecuencia representativos de la Cx somatomotora derecha-instilada de una rata macho; seguimiento de registro electrofisiológico durante 10 días.** El color rojo refleja un aumento en la potencia, en contraste el color azul indica una menor actividad. Nótese que en los primeros días de la abstinencia (1-2), se incrementa significativamente la actividad EEG, en la evolución temporal de la abstinencia se cuantifica una disminución de la hiperexcitabilidad neuronal que en promedio tiene una duración de 10 días.

La potencia promedio del electroencefalograma previa a la manipulación farmacológica fue de  $450.3 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en la corteza instilada y de  $426.5 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en la corteza contralateral. La actividad cortical basal está representada en colores azules-verdes en la gráfica del espectro de frecuencia. (Fig. 6, día -1).

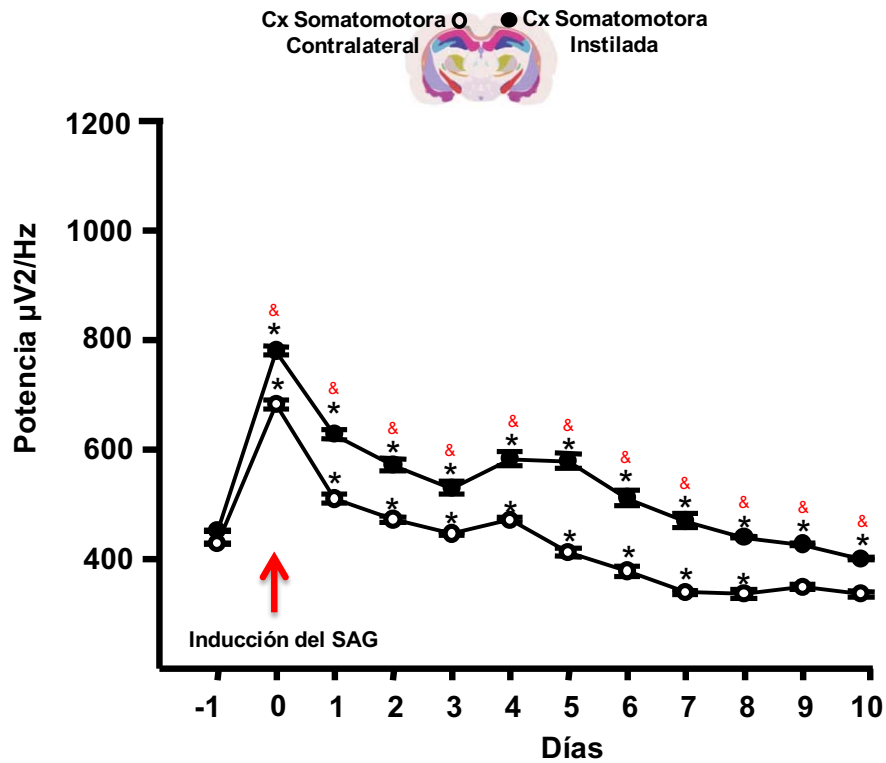
Al realizar el análisis del espectro de frecuencia de 4-20 Hz en ambas cortezas cerebrales durante el día de inducción del SAG (día 0), se cuantificó que la potencia tuvo un promedio de  $778.8 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en la corteza cerebral instilada, incremento correspondiente al 173% comparado con la estado basal (Fig. 7, círculos negros,  $p \leq 0.001$ ). En la corteza cerebral contralateral se cuantificó un incremento de  $680.4 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en la potencia correspondiente a un incremento de 151% comparado con la condición basal (Fig. 7, círculos blancos,  $p \leq 0.001$ ).

En la evolución temporal de la abstinencia el incremento en la potencia EEG disminuye gradualmente. La amplitud de la señal electroencefalográfica es significativamente mayor en la corteza cerebral instilada comparada con la corteza cerebral contralateral ( $p \leq 0.001$ ).

Se cuantificaron el número de complejos espiga-onda de alta amplitud y frecuencia del electroencefalograma durante la abstinencia a GABA, esta manifestación electroencefalográfica es característica de fenómenos de hiperexcitabilidad neuronal. En la Fig. 8, panel I, se muestran trazos EEG representativos en tres condiciones, en **A** la estado basal (A, día -1), en **B** el día de

inducción del SAG (**B**, día 0) y en **C** el día 10 de seguimiento (**C**, día 10).

### Análisis Cuantitativo del Espectro de Frecuencia del SAG en la Corteza Somatomotora



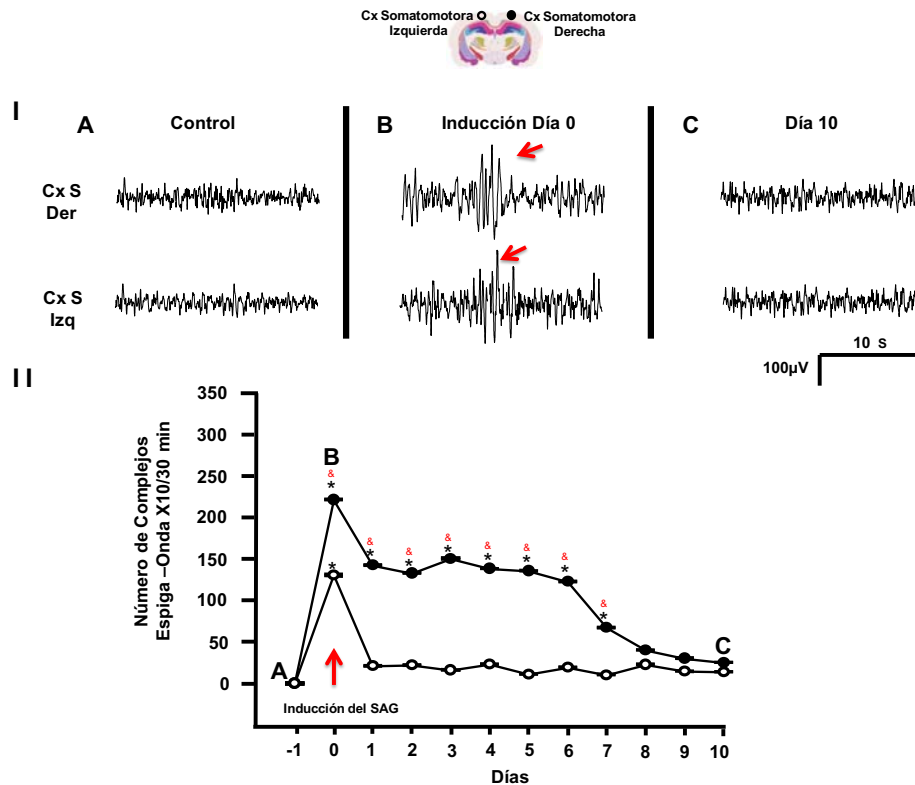
**Figura 7. Análisis cuantitativo del SAG en su espectro de frecuencia (4-20 Hz/ 30 min) min durante 10 días.** La gráfica muestra el incremento en la potencia EEG ( $\mu V^2/Hz$ ) en la evolución temporal de la abstinencia. Cx somatomotora instilada con **GABA** (círculos negros  $\bullet$ ; n=10) y Cx somatomotora contralateral (círculos blancos,  $\circ$ ; n=10). La flecha roja indica la inducción del SAG. Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey (\* $p \leq 0.001$  intra grupos. &  $p \leq 0.001$  entre grupos).

Al realizar la cuantificación de complejos espiga-onda se identificó que el día de inducción del SAG Cx (día 0), la corteza instilada tuvo en promedio  $2210.1 \pm 0.33$  espigas en un tiempo de 30 min (Fig. 8, panel II; círculos negros,  $p \leq 0.001$ ). El día posterior a la inducción de la abstinencia se registró un promedio de  $1420.2 \pm 0.4$  espigas, lo que representa una disminución del 35.74% comparado con el día de inducción en forma significativa. Los complejos espiga-onda disminuyen acercándose a niveles basales a partir del día 8 del inicio del SAG Cx.

En comparación, la corteza cerebral contralateral sólo tuvo un incremento en el número de complejos espiga-onda el (día 0) presentando un promedio de  $1300.1 \pm 1$  (Fig. 8, panel II; círculos blancos,  $p \leq 0.001$ ). La actividad epileptiforme disminuye a partir del día 1 del SAG.

Estos resultados electrofisiológicos corroboraron lo señalado anteriormente en relación con el SAG: **1)** la inducción de la abstinencia a GABA provoca un aumento en la potencia del EEG y la aparición de complejos espiga-onda, que durante la evolución temporal la abstinencia regresan a niveles basales en el día 10. **2)** En los estadios iniciales de la abstinencia la actividad epileptiforme de la corteza instilada se propaga a la corteza contralateral.

## Incremento de la actividad neuronal de la Corteza somatomotora y Contralateral durante del SAG



**Figura 8. Trazos EEG representativos y cuantificación de complejos espiga-onda.** En el panel superior I, en **A** se muestra la actividad EEG basal (día-1), en **B** se presenta la aparición de complejos espiga-onda el día de inducción de SAG (día 0), y en **C** se observa la ausencia de actividad epileptiforme el día 10 posterior a la inducción del SAG. (Cx S: corteza somatomotora. Der: derecha/ instilada; Izq: izquierda/ contralateral). En el panel II se grafican los complejos espiga-onda de la Cx somatomotora instilada (círculos negros, ●; n=10) y de la Cx somatomotora contralateral (círculos blancos, ○; n=10). La flecha roja indica la inducción del SAG. Media ± EE ANOVA Post Hoc Tukey (\*p≤0.001 intra grupos. & p≤0.001 entre grupos).

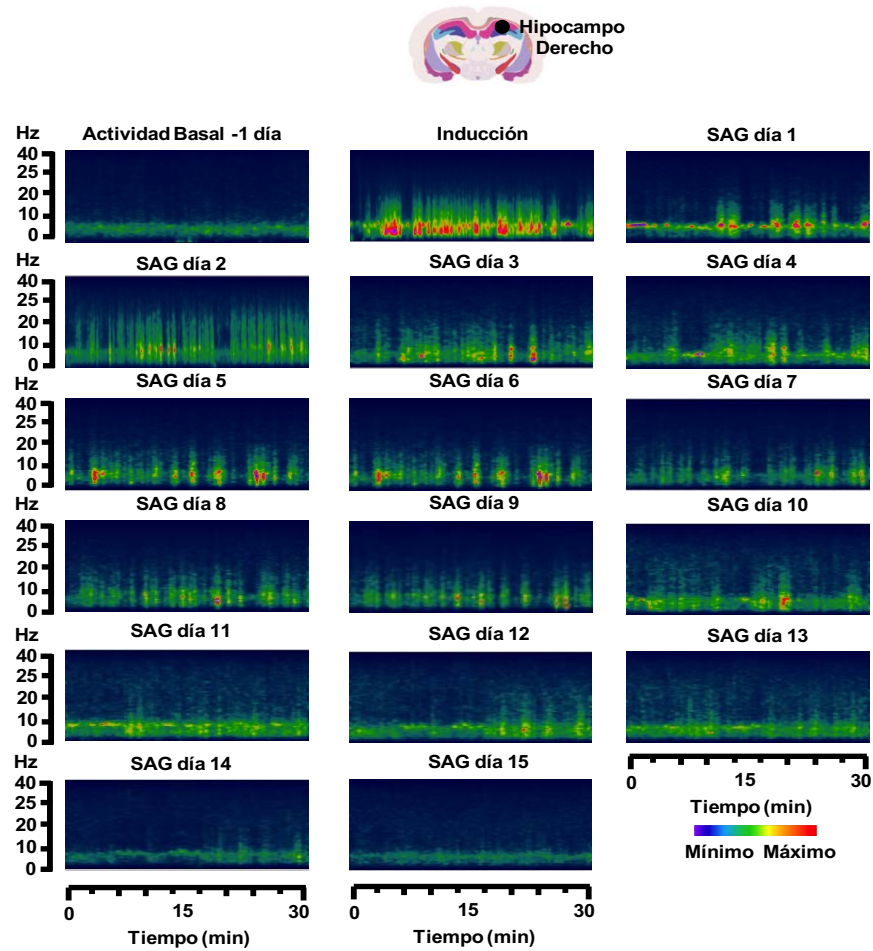


### **Análisis Electrofisiológico del SAG del hipocampo**

La siguiente serie de experimentos estuvo orientada a estandarizar e identificar por primera vez, mediante el registro electroencefalográfico, la señal EEG de la instilación de GABA (5mM/2h) en el área CA1 del hipocampo (SAG H) y sus modificaciones en la potencia electrofisiológica, frecuencia y duración de la hiperexcitabilidad neuronal.

En la Fig. 9 identificamos la evolución temporal del SAG H. Semejante a lo que sucede en la corteza cerebral, la manifestación electrofisiológica del SAG H se caracterizó por un aumento en la potencia en la banda de frecuencia de 4-20 Hz, la aparición de complejos espiga-onda de gran amplitud y frecuencia que fueron disminuyendo de manera gradual. En el análisis de frecuencia de Wavelets se observa la evolución electrofisiológica del SAG H el aumento de la potencia se observa por la aparición de colores rojos amarillos (Fig. 9).

## SAG en el Hipocampo



**Figura 9.** Espectros de frecuencia representativos del hipocampo derecho-instilado de una rata macho; seguimiento de registro electrofisiológico durante 15 días. El aumento en la potencia se ve reflejado por la aparición de colores cálidos, mientras que los colores azules-verdes indican una menor actividad. Nótese que en los primeros días de la abstinencia (1-2), se incrementa de manera significativa la actividad EEG, cuantificándose una disminución gradual y desaparición en los días 14-15.

La potencia promedio del EEG antes de la manipulación farmacológica fue de  $533 \pm 1.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en el hipocampo instilado y de  $510 \pm 1.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en el hipocampo contralateral. La actividad basal está representada en colores azules-verdes en la gráfica del espectro de frecuencia (Fig. 9, día -1). Mediante el análisis electrofisiológico se identificó que no hubo presencia de actividad espiga-onda, cambios en la amplitud o frecuencia en el hipocampo.

El día de inducción del SAG H (día 0) la potencia del EEG tuvo un promedio de  $1120 \pm 1.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  en el hipocampo instilado, incremento correspondiente al 210.1% comparado con la condición basal (Fig. 10, círculos negros,  $p \leq 0.001$ ). El hipocampo contralateral presentó un incremento en la potencia de  $778. \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  incremento correspondiente de 152% comparado con la condición basal (Fig. 10, círculos blancos,  $p \leq 0.001$ ).

La potencia del EEG disminuye gradualmente hasta regresar a niveles basales entre el día 14-15. La señal EEG presentó mayor amplitud significativa en el hipocampo instilado comparado con el hipocampo contralateral ( $p \leq 0.001$ ).

En la Fig. 11, panel I, se muestran trazos EEG de un animal, representativos de esta serie de experimentos en relación con la evolución de la actividad electroencefalográfica durante el registro control (**A**), inducción del SAG (**B**) y seguimiento día 15 (**C**).

### SAG en el Hipocampo

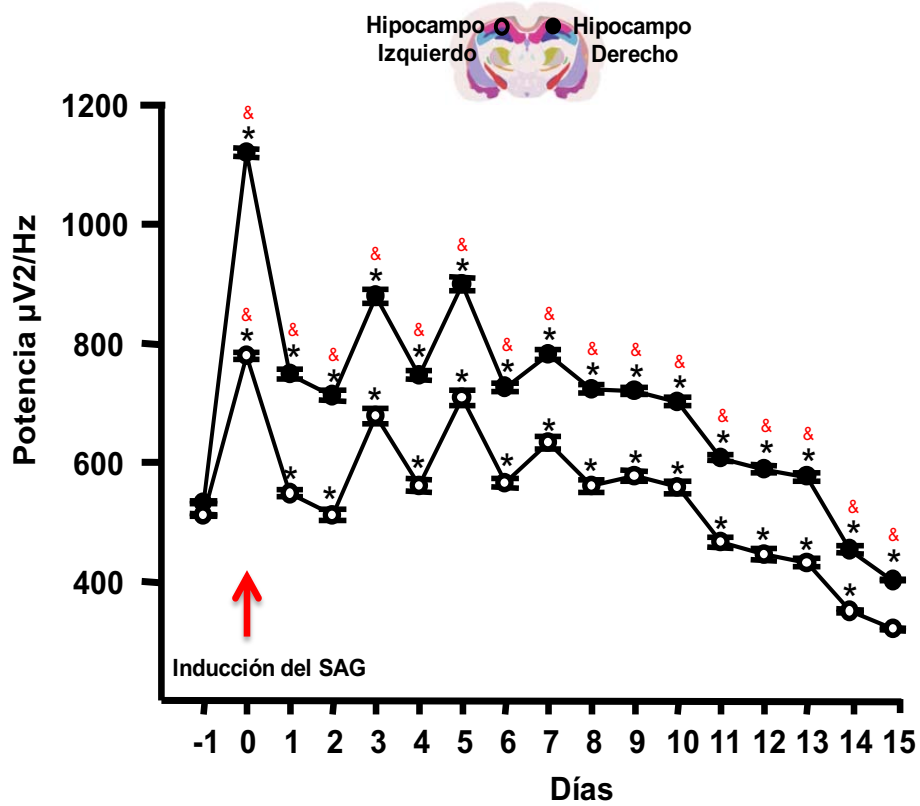


Figura 10. Análisis cuantitativo del SAG del hipocampo en su espectro de frecuencia (4-20 Hz/ 30 min) min durante 15 días. Se gráfica la cuantificación del incremento en la potencia EEG ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ) en la evolución temporal de la abstinencia del Hipocampo instilado con GABA (círculos negros, ●; n=10) y en el Hipocampo contralateral (círculos blancos, ○; n=10). La inducción del SAG está indicado por la flecha roja. Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey (\* $p \leq 0.001$  intra grupos. &  $p \leq 0.001$  entre grupos).

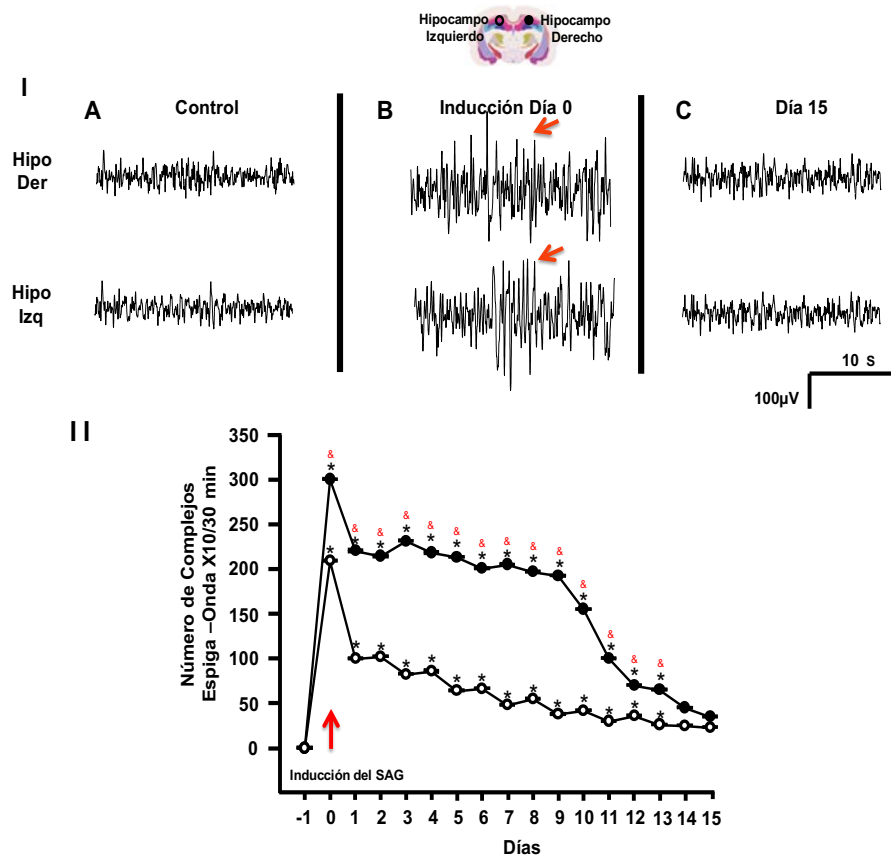
Mediante el análisis cuantitativo de los complejos espiga-onda, identificamos que en el hipocampo instilado el día de inducción se manifestaron  $3000 \pm 0.33$  complejos espiga-onda en 30 min (Fig. 11, panel II; círculos negros,  $p \leq 0.001$ ). El promedio de espigas que se presentaron el día posterior de la abstinencia fue de  $2220.2 \pm 1$ , lo cual se traduce como una disminución del 26% representando una diferencia significativa con el día de inducción. En el curso temporal de la abstinencia los complejos espiga-onda disminuyen regresando a niveles basales los días 14-15 posterior a la inducción.

En contraste de lo que sucede en el hipocampo instilado, el hipocampo contralateral presenta un incremento en el número de complejos espiga-onda sólo el día de inducción (día 0), con un promedio de  $2009 \pm 0.22$  (Fig. 11, panel II; círculos blancos,  $p \leq 0.001$ ). A partir del día 1 del SAG se identifica la disminución de la actividad epileptiforme en el hipocampo contralateral.

Esta serie de experimentos demuestran por primera vez que:

- 1) el **SAG H** incrementa la potencia electroencefalográfica, aumentando la frecuencia generando la aparición de complejos espiga-onda;
- 2) Disminuye de manera gradual y desaparece los días 14-15;
- 3) La actividad epileptiforme del hipocampo instilado se propaga al hipocampo contralateral.

## SAG en el Hipocampo



**Figura 11. Trazos EEG representativos y cuantificación de complejos espiga-onda del SAG del hipocampo.** En el panel superior I; en **A** se observa la actividad EEG basal (día-1), en **B** se aprecia la aparición de complejos espiga-onda el día de inducción de la abstinencia a GABA(día 0), y en **C** se muestra la ausencia de actividad epileptiforme el día 14-15 posterior a la inducción del SAG. (Hipo Der: hipocampo derecho. Hipo Izq.: hipocampo izquierdo. En II se grafica a los complejos espiga-onda de la Hipocampo derecho/instilado (círculos negros, ●; n=10) y del hipocampo izquierdo/contralateral (círculos blancos, ○; n=10). La inducción del SAG está indicada con la flecha roja. Media ± EE ANOVA Post Hoc Tukey (\*p≤0.001 intra grupos. & p≤0.001 entre grupos).

### Comparación SAG Hipocampo y Corteza Cerebral

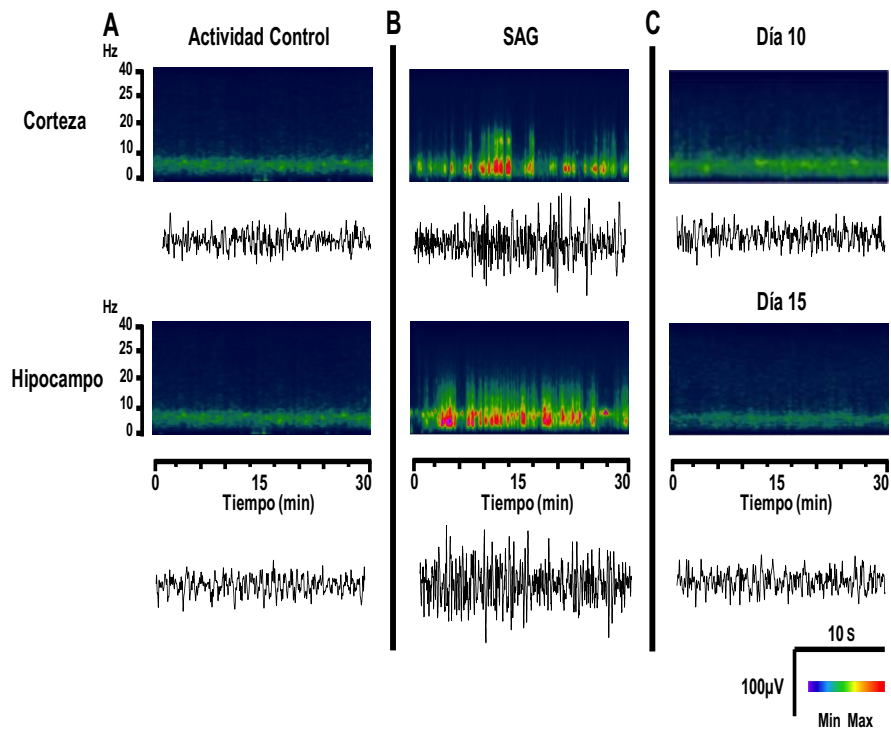
La corteza cerebral y el hipocampo son diferentes estructuras que presentan distinta organización neuronal, el hipocampo es una estructura con organización trisináptica y más epileptogénica que la corteza cerebral. Mediante esta premisa identificamos los siguientes resultados.

En la Fig. 12 se muestran espectros de frecuencia y trazos EEG representativos del hipocampo/instilado y la corteza cerebral/instilada de un registro EEG control (**A**), la inducción del SAG (**B**) el último día de abstinencia (**C**).

El promedio EEG de la actividad control de la corteza cerebral fue de  $450.3 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , y del hipocampo fue de  $533 \pm 1.9 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ . Los colores verdes-azules representan este tipo de actividad (Fig. 12).

La duración de la actividad epileptiforme del SAG de la corteza fue de 10 días, en contraste la actividad del hipocampo regresó a niveles basales el día 15 (Fig. 12, panel C).

## El SAG del hipocampo presenta mayor potencia EEG que el SAG de la corteza cerebral



**Figura 12. El SAG del hipocampo es más potente que el SAG de la corteza cerebral, espectros de frecuencia y registros EEG representativos de la Cx somatomora instilada, y del Hipocampo instilado.** El color rojo indica un aumento en la potencia, a diferencia del color azul que indica una menor actividad EEG. En A, se observa el espectro y trazos EEG de la actividad control de un animal; B muestra la inducción del SAG. En C se presentan trazos EEG y espectros de frecuencia representativos correspondientes al último día de abstinencia. Nótese que en el SAG del hipocampo se incrementa significativamente la actividad EEG, en comparación con la corteza cerebral. Se cuantificó una disminución gradual de la hiperexcitabilidad neuronal del SAG de la corteza cerebral regresando a niveles basales el día 10, en contraste el SAG del hipocampo regresa a niveles basales.



Al realizar el análisis diferencial electrofisiológico entre el SAG Cx y el SAG H, se cuantificaron diferencias significativas. El día de inducción del SAG Cx (día 0) la potencia EEG tuvo es de  $778.8 \pm 1.8 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , incremento correspondiente al 172.9% (Fig. 13, triángulos blancos,  $p \leq 0.001$ ). En contraste, el SAG H presentó un aumento en la potencia de 210.1% identificado con un promedio de  $1120 \pm 1.7 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$  (Fig. 13, Círculos negros,  $p \leq 0.001$ ). Esto demuestra que el SAG H se caracteriza por un mayor incremento en la potencia del EEG en comparación con el SAG Cx.

Esto puede deberse a las conexiones neuronales y la red de inhibición distinta en ambas estructuras. Asimismo a la diferencia de subunidades del receptor  $\text{GABA}_A$  (Fig. 13).

El SAG H tiene mayor duración que el SAG Cx, esto significa que el hipocampo es la estructura que responde con mayor actividad neuronal por la abstinencia al GABA.

### Diferencias electroencefalográficas del SAG en el hipocampo y la corteza cerebral

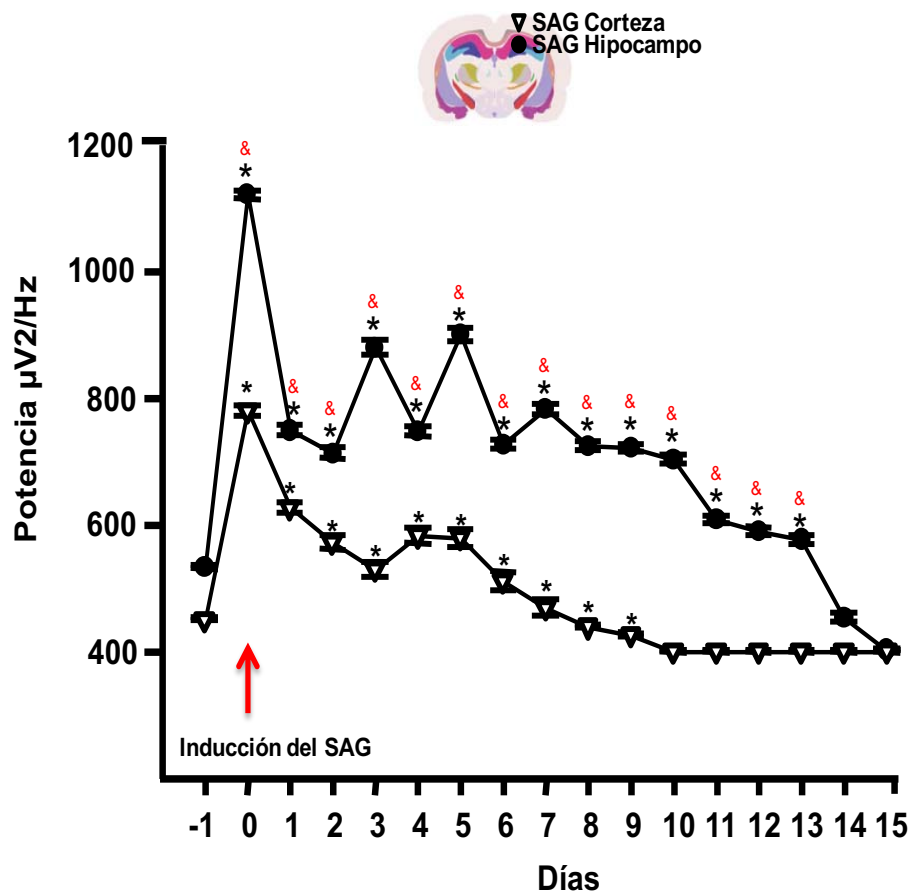


Figura 13. Análisis cuantitativo del incremento en la potencia EEG en el hipocampo y la corteza cerebral durante el SAG. Se observa el cambio en la potencia EEG ( $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ) en la evolución temporal de la abstinencia del Hipocampo instilado con GABA (círculos negros, ●;  $n=10$ ) y la corteza instilada (triángulos blancos, ▽;  $n=10$ ). La flecha roja indica la inducción del SAG. Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey (\* $p \leq 0.001$  intra grupos. &  $p \leq 0.001$  entre grupos).

El análisis cuantitativo del número de complejos espiga-onda, permite identificar que el SAG Cx presentó el día de inducción (día 0)  $2210.1 \pm 0.33$  complejos espiga-onda (Fig. 14, triángulos blancos,  $p \leq 0.001$ ). En comparación el SAG H tuvo en promedio  $3000 \pm 0.33$  complejos espiga-onda (Fig. 14, círculos negros,  $p \leq 0.001$ ), siendo este el que tuvo mayor frecuencia de aparición de complejos espiga-onda.

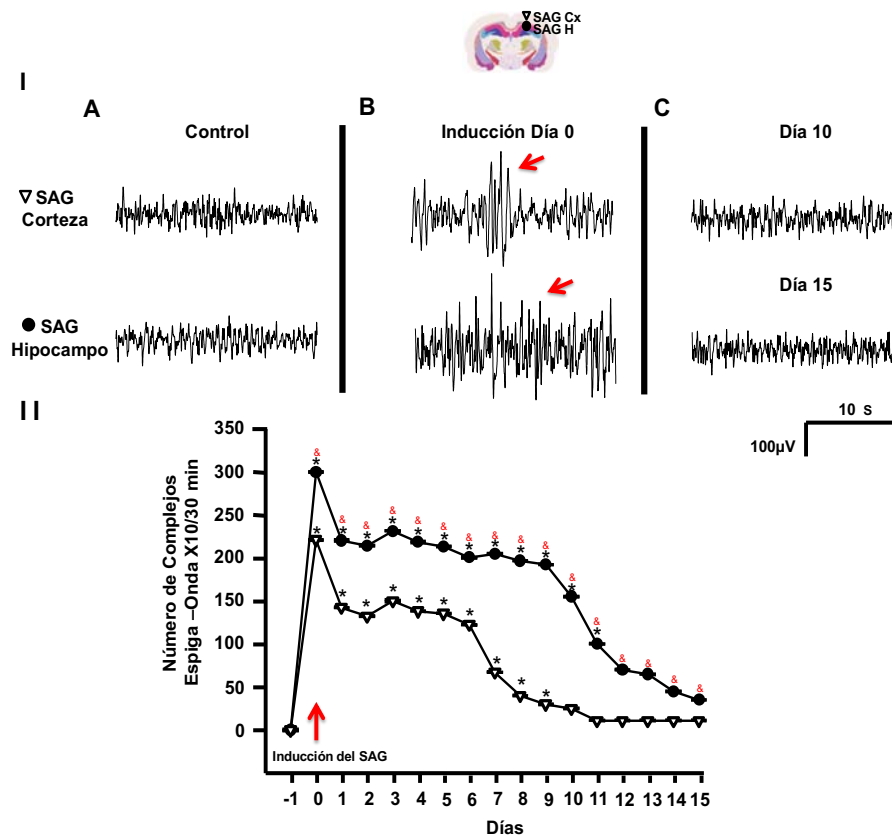
El SAG Cx y el SAG H presentaron el día de su inducción una gran actividad epileptiforme, manifestada mediante la aparición de un incremento en la frecuencia electrofisiológica. La cuantificación de complejos espiga-onda identificó que el SAG Cx tuvo un promedio de 1.2 espigas por segundo. El SAG H presentó un incremento significativamente mayor en la actividad electrofisiológica epiléptica identificado con un promedio de 1.6 espigas por segundo, un 33% de mayor actividad.

Los resultados de esta serie de experimentos demostraron: **1)** El SAG H es más potente que el SAG Cx; **2)** ya que la aparición de complejos espiga onda de alta amplitud y frecuencia es mayor en el hipocampo; **3)** El SAG H el hipocampo tiene mayor duración.

**Tabla 2. Número de Espigas/Segundo del SAG Cx y el SAG H**

<b>Grupo</b>	<b>Espigas por segundo</b>
<b>SAG H</b>	<b><math>1.6 \pm 0.1</math></b>
<b>SAG Cx</b>	<b><math>1.2 \pm 0.1</math></b>

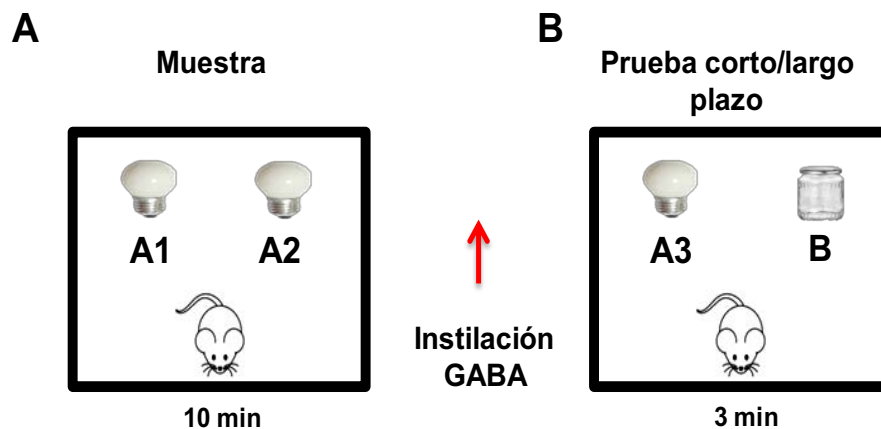
## Diferencias del incremento de la Actividad neuronal del SAG Cx y el SAG H



**Figura 14. Trazos EEG representativos y cuantificación de complejos espiga-onda del SAG H y el SAG Cx.** En el panel superior: I, en **A** se aprecia la actividad control (día-1), en **B** se observa la aparición de complejos espiga-onda el día de inducción de la abstinencia a GABA(día 0), y en **C** se observa el último día de la abstinencia respectivo para el SAG Cx y el SAG H. En II se muestra el número de complejos espiga-onda del SAG H derecho/instilado (círculos negros, ●; n=10) y del SAG Cx derecha/Instilada (triángulos blancos, ▽; n=10). La inducción del SAG está indicada con la flecha roja. Media ± EE ANOVA Post Hoc Tukey (\*p≤0.001 intra grupos. & p≤0.001 entre grupos).

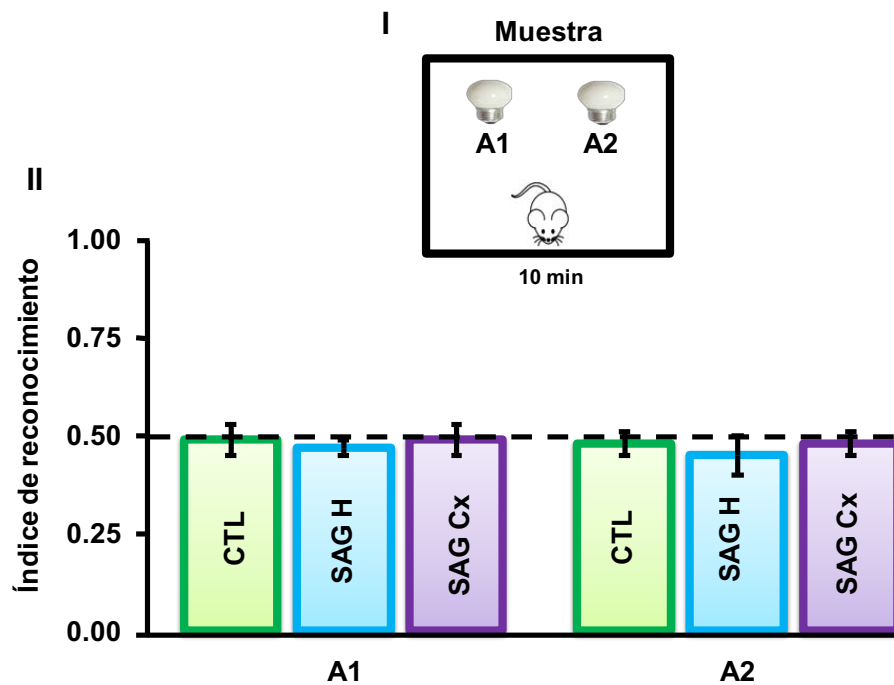
### El SAG en el hipocampo o el de la corteza cerebral no modifica la memoria a corto y largo plazo

Después de identificar la actividad epileptiforme del SAG Cx o el área CA1 del hipocampo. Se cuantificó el efecto en la memoria a corto y largo plazo, evaluado a través de la prueba de reconocimiento de objetos (Fig. 15). Se calculó un índice de reconocimiento de objetos el cual indicó la cantidad de tiempo que el animal pasaba en un objeto, dividido entre la exploración total. Un índice de reconocimiento menor o igual a 0.5 indica que no hay preferencia por algún objeto, un índice mayor de 0.5 indica que hay preferencia sobre el objeto novedoso.



**Fig. 15. Protocolo conductual de la prueba de reconocimiento de objetos.** En A se observa la fase de muestra dónde se coloca a la rata mirando al lado opuesto donde se encuentran los dos objetos idénticos llamados (A1 y A2) durante 10 minutos. B. Posterior a la instilación de GABA se realizó la prueba de memoria a corto, largo plazo introduciendo a la rata con dos objetos: un objeto idéntico al mostrado previamente; objeto familiar (A3) y un nuevo objeto llamado novedoso (B) por 3 minutos

El grupo control, el del hipocampo y el de la corteza cerebral tuvieron una fase de muestra previa a su respectiva prueba de evaluación de la MCP en la que tuvieron un tiempo similar de exploración en los objetos idénticos (A1, A2). Esto validado mediante la cuantificación del índice de reconocimiento que mostró que los animales no tenían preferencia por algún objeto asimismo, no presentaron diferencias significativas en la fase de muestra de la prueba de reconocimiento de objetos (Fig.16).



**Fig. 16. Fase de muestra de la prueba de reconocimiento de objetos a corto plazo. I:** Representación de la fase de muestra de la prueba de reconocimiento de objetos. **II:** Índices de reconocimiento cuantificados durante la fase de muestra de la prueba de memoria a corto plazo de los objetos idénticos A1, A2. Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey.

Después de la interrupción abrupta de la instilación de GABA se realizó la prueba de memoria a corto plazo, todos los grupos tuvieron un tiempo de exploración mayor por el objeto novedoso, esto cuantificado mediante el índice de reconocimiento que en los tres grupos fue mayor de 0.5; CTL:  $0.78 \pm 0.05$ , SAG Cx:  $0.86 \pm 0.01$ , SAG H:  $0.86 \pm 0.01$  (Fig. 17). Estos resultados indican que la memoria no fue modificada, y que la hiperexcitabilidad neuronal inducida por el SAG en la corteza cerebral y en el área CA1 del hipocampo no modifica la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo.

### La memoria de corto plazo no se modifica por el SAG Cx o el SAG H

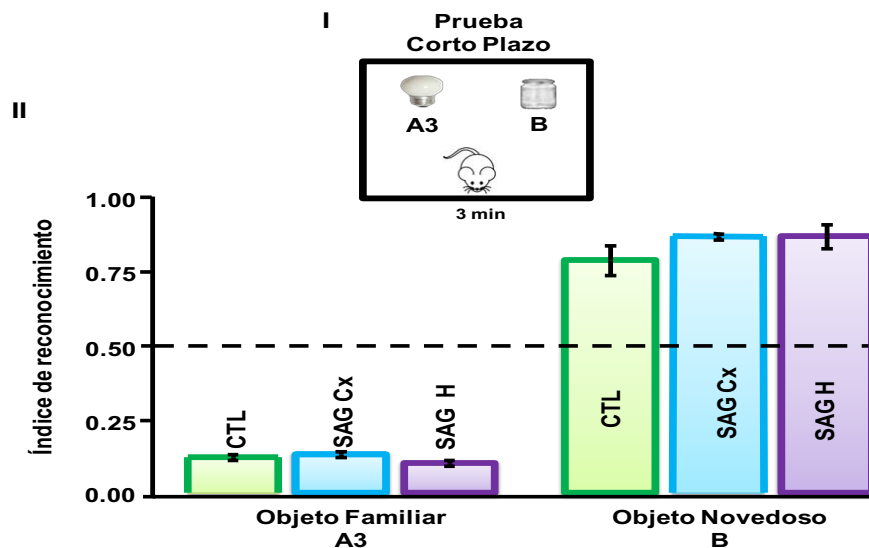


Fig. 17. Evaluación de la memoria a corto plazo, de la prueba de reconocimiento de objetos. I: Representación esquemática de la prueba. II: Índices de reconocimiento cuantificados durante la evaluación de la memoria a corto plazo del objeto familiar (A3) y el objeto novedoso (B). Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey.

Durante la fase de muestra previa de la prueba de memoria a largo plazo (Fig. 18), todos los grupos tuvieron tiempos similares en la exploración de los objetos idénticos (A1, A2). Se obtuvieron los índices de reconocimiento y no se encontraron diferencias significativas. Indicando esto que los animales no tuvieron preferencia por ningún objeto.

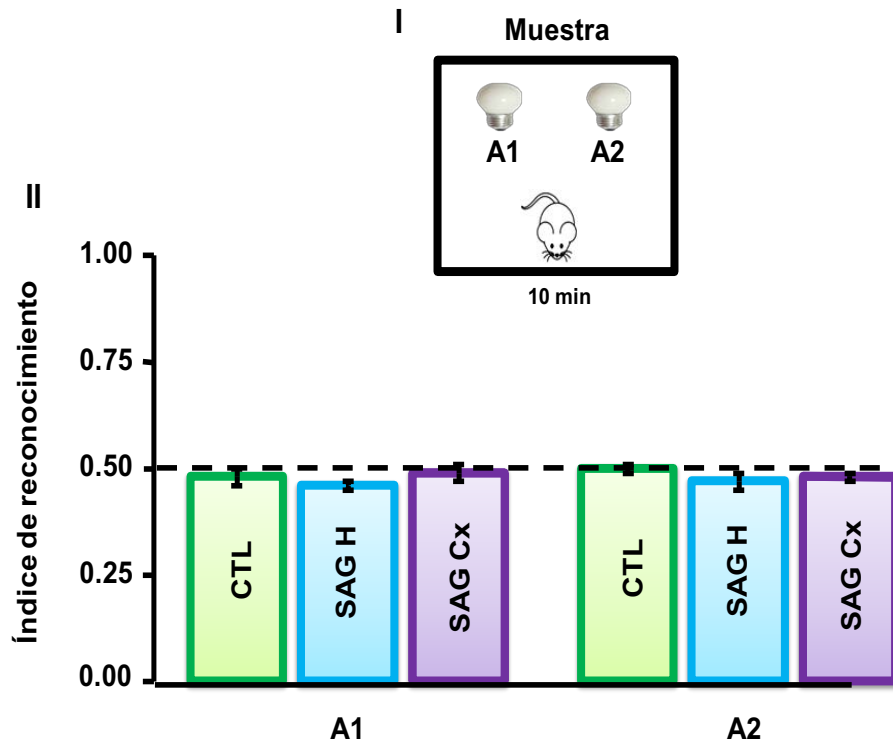


Fig. 18. Fase de muestra de la prueba de reconocimiento de objetos a largo plazo. I: Representación de la fase de muestra de la prueba de reconocimiento de objetos. II: Índices de reconocimiento cuantificados durante la fase de muestra de la prueba de memoria a largo plazo de los objetos idénticos A1, A2. Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey.



En la Fig. 19 se muestra la evaluación de la memoria a largo plazo que se realizó 24 h después de la instilación de GABA, a todos los animales se les mostró un objeto familiar y un objeto novedoso. En el apartado II se observa la cuantificación de los índices de reconocimiento del objeto novedoso y el familiar. El grupo **CTL** obtuvo un índice de:  $0.75 \pm 0.08$ , el grupo **SAG Cx**:  $0.96 \pm 0.05$  y el grupo **SAG H**:  $0.88 \pm 0.07$ . Todos los grupos mostraron preferencia por el objeto novedoso, indicando que la consolidación de la memoria no fue modificada por el SAG.

### La memoria a largo plazo no se modifica por el SAG Cx y el SAG H

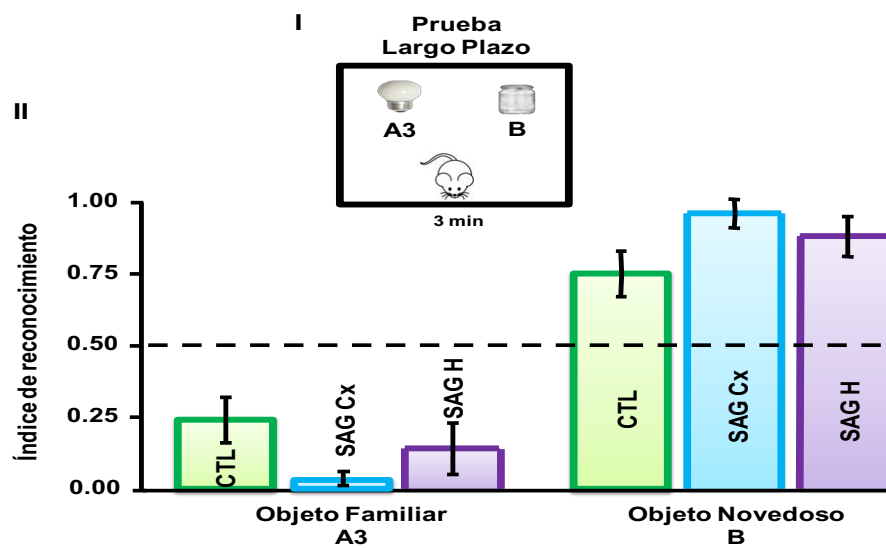


Fig. 19. Evaluación de la memoria a largo plazo, de la prueba de reconocimiento de objetos. I: Esquema de la prueba de la memoria a largo plazo II: Índices de reconocimiento cuantificados durante la evaluación de la memoria a largo plazo del objeto familiar (A3) y el objeto novedoso (B). Media  $\pm$  EE ANOVA Post Hoc Tukey.

Estos resultados indican: **1)** El SAG Cx, y el SAG H no modifican la memoria a corto plazo; **2)** La hiperexcitabilidad neuronal del SAG de la corteza cerebral no modifica la formación de la memoria a largo plazo; **3)** La actividad epileptiforme característica del SAG del hipocampo tampoco modifica la memoria a largo plazo.

### **Cuantificación de la ansiedad en el estadio Inicial del SAG**

Utilizando el LEC es posible realzar la medición de la ansiedad en roedores. En la presente tesis fue utilizada para evaluar la conducta de ansiedad que aparece en los estadios iniciales del SAG. Se cuantificó el porcentaje del tiempo de permanencia en los BC y los BA; así como, el número de entradas en cada uno de los brazos, de esta manera mayor permanencia en BC se considera una conducta de ansiedad (Rodgers *et al.*, 1997; Pellow *et al.*, 1985)..

Estudios previos demostraron que el SAG Cx generaba un perfil tipo ansioso en la rata (Segovia, 2014). Uno de los objetivos de esta tesis fue cuantificar las diferencias de la conducta de ansiedad generada por la abstinencia a GABA en la corteza cerebral y el área CA1 del hipocampo. La siguiente serie de experimentos identifica por primera vez las diferencias en la conducta tipo ansiosa del SAG Cx y el SAG H.

La inducción de la abstinencia en dos distintas áreas cerebrales genera niveles similares de ansiedad

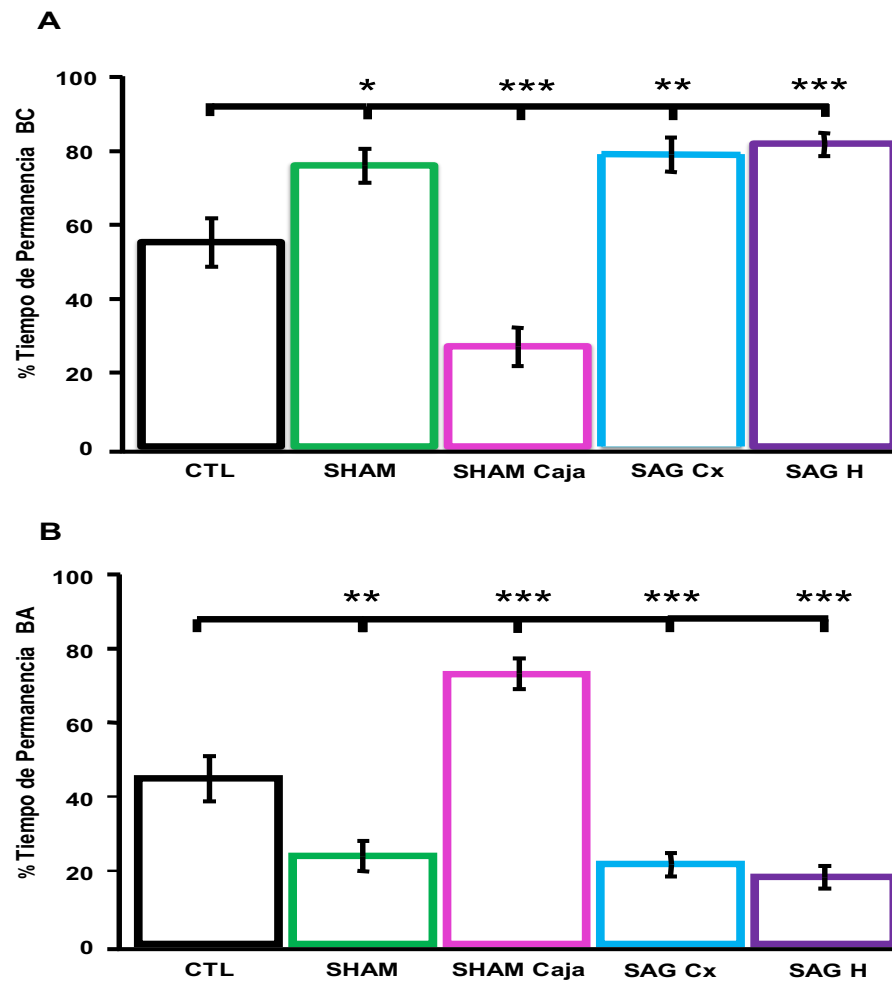


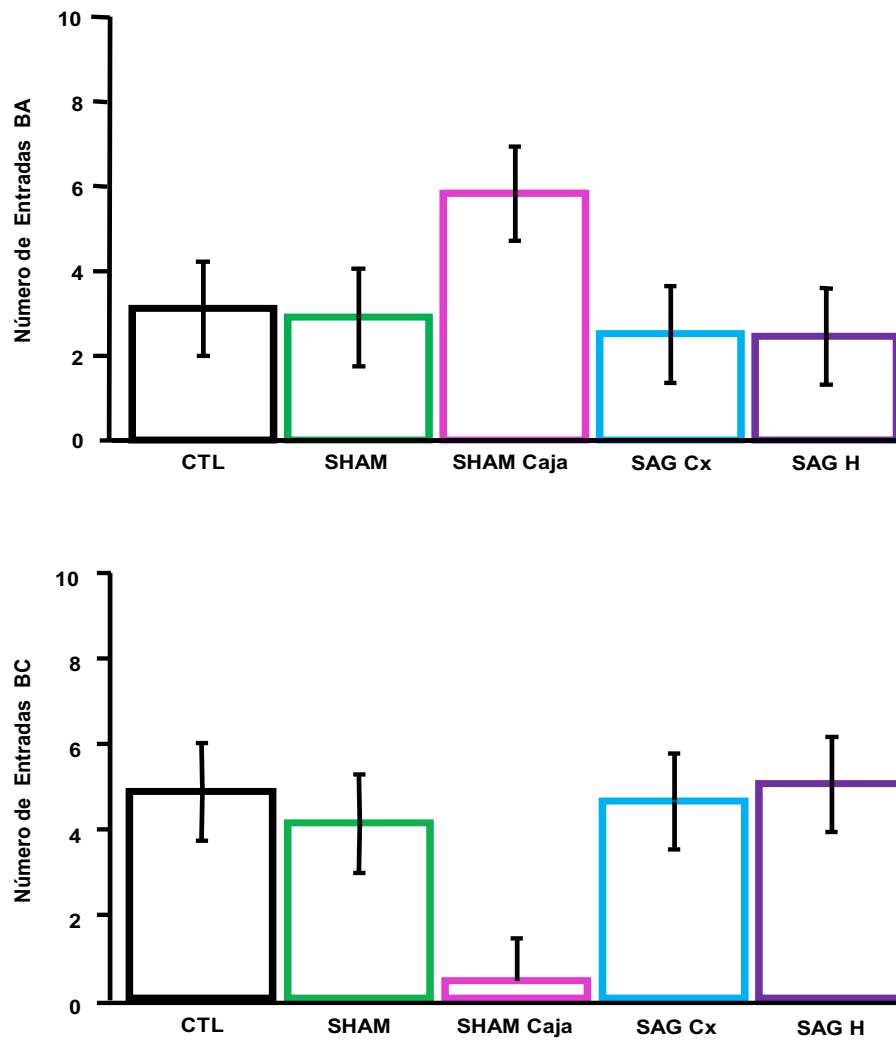
Fig. 20. El SAG Cx y el SAG H tienen en común inducir ansiedad. En esta prueba mayor tiempo de permanencia en BC esta asociado con una conducta de ansiedad. En **A** se gráfica el porcentaje de tiempo de permanencia en BC y en **B** el tiempo de permanencia en BA. (\*\*  $p \leq 0.01$  \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). Media  $\pm$  EE. ANOVA Post Hoc Tukey.

Los resultados confirmaron que el SAG Cx y el SAG H generan un perfil tipo ansioso en la rata. Cuantificado mediante el porcentaje de tiempo de permanencia **SAG Cx**; BC (Fig. 19-A, Barras azules,  $21.5 \pm 3.2$ ,  $p \leq 0.001$ ) y BA (Fig. 20-B, Barras azules,  $79 \pm 4.6$ ,  $p \leq 0.001$ ) **SAG H**; (Fig. 20-A, Barras moradas, BA:  $18.1 \pm 3.1$ , BC:  $81.8 \pm 3.1$ ,  $p \leq 0.001$ ) en comparación al grupo **Control** (Fig. 20-A, Barras negras, BA:  $18.1 \pm 3.1$ , BC:  $81.8 \pm 3.1$ ,  $p \leq 0.001$ ). Se identificó que el Grupo SHAM Caja obtuvo el mayor tiempo de permanencia en BA ( $73 \pm 5.5$ , barras rosas,  $p \leq 0.001$ ) y un menor tiempo en BC ( $27 \pm 5.2$ , barras rosas,  $p \leq 0.001$ ) indicando esto que la habituación tiene un impacto positivo sobre la conducta de ansiedad.

No se identificaron diferencias significativas en porcentaje de tiempo de permanencia en BC y BC, ni en el número de entradas, entre los grupos SAG Cx y SAG H (Fig. 21).

Esta serie de experimentos demostró: **1)** la inducción del SAG en dos distintas áreas cerebrales genera un perfil tipo ansioso; **2)** El grupo SHAM que recibió tratamiento de habituación obtuvo los niveles más bajos en porcentaje de permanencia en BC y un porcentaje mayor en BA y **3)** El SAG Cx y el SAG H tienen niveles similares de ansiedad.

**La inducción de abstinencia en dos distintas áreas cerebrales genera niveles similares de ansiedad**



**Fig. 21. Cuantificación del número de entradas a BC y BA.** No se encontraron diferencias significativas en el número de entradas a BA y BC. En **A** se gráfica el número de entradas a BA. En **B** el número de entradas a BC. Media  $\pm$  Er EE ANOVA Post Hoc Tukey.

## **VI. Discusión**

### **Generalidades**

Los resultados de la presente tesis indican que la interrupción abrupta de la instilación de GABA en la corteza cerebral y en el área CA1 del hipocampo incrementa la potencia electrofisiológica e induce una actividad epileptiforme caracterizada por la aparición de complejos espiga onda de gran amplitud y alta frecuencia. Se identificó que el SAG de la corteza cerebral tiene una duración de 10 días y tiene una frecuencia de descarga de 1.2 espiga/seg. El SAG en el área CA1 del hipocampo tiene un 20% mayor potencia EEG, es un 50% mayor en duración y 30% más fuerte en frecuencia. Asimismo, el SAG Cx y el SAG H no modifican la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo. Además en ambas estructuras el SAG induce un perfil tipo ansioso.

### **Análisis espectral de Wavelets del SAG**

La evolución temporal de un electroencefalograma en una crisis convulsiva o de una hiperexcitabilidad neuronal no es estacionaria, existen eventos transitorios como los complejos espiga-onda y descargas de potenciales sinápticos poblacionales que son estocásticos, es decir, no tienen un patrón homogéneo (Fernández-Más *et al.*, 1998). Esta es la razón por la cual se utilizó el análisis de frecuencia de Wavelets para analizar la señal EEG del SAG.

El análisis de Wavelets representa la mejor herramienta matemática para analizar los cambios en la amplitud y voltaje,

asociados a la frecuencia de eventos estacionarios y transitorios. Describe un fenómeno eléctrico sincrónico o con cambios en la frecuencia. Un incremento en la actividad EEG (amplitud) lo modifica a colores cálidos (rojo-naranja) en contraste, su reducción se cuantifica con colores fríos (verdes-azules). En esta tesis identificamos que la actividad eléctrica basal de los animales en estado de vigilia, se encontraba en una banda de frecuencia de 4 a  $10 \mu\text{V}^2/\text{Hz}$ , lo cual ha sido ampliamente descrito en diversos estudios. Los resultados de esta tesis indican que el incremento de la potencia EEG por el SAG, se manifiesta por la aparición de colores amarillo-rojos. El SAG Cx muestra una actividad epileptiforme de: 1.2 espigas/seg en la banda de frecuencia de 4-15 Hz. El SAG H muestra: 1.6 espigas/seg.

### **Neurobiología de los cambios del SAG**

El primer objetivo específico de esta tesis fue analizar las diferencias y similitudes del número de complejos espiga onda y potencia EEG del SAG Cx y el hipocampo, en el estudio de la hipótesis que plantea una mayor excitabilidad por parte del hipocampo.

Datos previos de nuestra línea de investigación indican que los estadios tempranos de la inducción del SAG Cx generan varios cambios en los componentes de la sinapsis (Calixto, 2016). Por ejemplo, en el componente presináptico disminuye la síntesis y liberación de GABA por lo que, la concentración de GABA es dos veces menor que en condiciones control (Salazar, 1994). Dentro del

componente postsináptico hay una disminución en el número de receptores GABA<sub>A</sub> (*down regulation*) y eventualmente se asocia a cambios en la expresión de subunidades del receptor ionotrópico, por ejemplo, la expresión de la subunidad  $\alpha$  es la más sensible y frecuente en modificarse lo cual contribuye a cambios en la fosforilación del receptor, cinética de activación e inactivación y afinidad por el ligando (Brailowsky *et al.*, 1988; Will *et al.*, 1988). Conocemos que la conductancia de calcio se incrementa significativamente en el componente postsináptico, como en cualquier fenómeno de epilepsia estas oscilaciones frecuentes de calcio por parte del componente postsináptico son responsables de los procesos de epileptogénesis en el inicio y el mantenimiento de las descargas ictales, por lo que la parte postsináptica representa uno de los grandes retos de estudio para identificar las diferencias entre diferentes sitios anatómicos de inicio como posibles entidades para el tratamiento de crisis epilépticas.

La fenomenología de inducción del SAG se debe a que primero ocurren cambios en la neurotransmisión GABAérgica y posteriormente se instalan modificaciones de otras neurotransmisiones: glutamatérgica, colinérgica, adrenérgica y dopaminérgica (Brailowsky, 1991; Calixto, 2016) en otras palabras, la actividad epileptiforme (complejos espiga-onda de alta frecuencia, propagación de la actividad y aumento de la potencia del EEG) que se cuantifica posterior a la interrupción de la infusión de GABA depende directamente de la disminución del tono GABAérgico, y que gradualmente se agrega el incremento de la actividad de los



receptores a glutamato (NMDA y AMPA), asociado a un aumento del tono colinérgico y adrenérgico, asociado a cambios en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. No obstante la ventana temporal de los sucesos sináptico-moleculares son difíciles de indicar, nuestra línea investigación demuestra que en las primeras 24 h, el evento de inicio depende exclusivamente de los cambios de la neurotransmisión GABAérgica (Menini *et al.*, 1991; Araneda *et al.*, 1994; Silva-Barrat *et al.*, 1995; Silva-Barrat *et al.*, 2005; Silva-Barrat *et al.*, 2001; Calixto, 2012; Calixto, 2016).

Al interrumpir de manera abrupta la instilación de GABA se genera un foco epiléptico, la corteza y el hipocampo contralateral también se activan de manera significativa generando un mecanismo de reverberancia en la comunicación neuronal que se identifica en el electroencefalograma. La evolución temporal del SAG nos indicó que la propagación es muy fuerte en los primeros estadios de la abstinencia; y que no obstante a que está hiperexcitabilidad continua la propagación desaparece prácticamente a la mitad del síndrome (Fig. 13).

### **Analogías y diferencias de la corteza cerebral y el área CA1 del hipocampo durante el SAG**

El hipocampo es una estructura involucrada en una variedad de funciones cerebrales, incluyendo la memoria, la atención, reverberancia informativa y el aprendizaje. El hipocampo está organizado en un circuito trisináptico, en el cual la información es a

través de neuronas piramidales modulada directamente por interneuronas GABAérgicas, esto garantiza que la información que pasa por el hipocampo es perfectamente organizada, filtrada e inhibida. Dos estímulos de gran importancia e incluso de misma frecuencia no pueden ser analizados de la misma manera, ya que las interneuronas GABAérgicas inhiben al segundo. La organización celular la corteza cerebral es columnar, la información además puede interaccionar por las diferentes láminas histológicas de su estructura, es decir, la integración sináptica es más complejo y esto tiene implicaciones electrofisiológicas del registro del EEG. Esta es la razón por la cual la amplitud basal del EEG del hipocampo ( $533\pm 1.9$ ) sea discretamente mayor a la de la corteza cerebral ( $450\pm 1.8$ ) siendo una estructura más pequeña el hipocampo es más excitable por su componente sináptico: esta es una de las razones fundamentales por la cual, el SAG H tiene mayor potencia, frecuencia y duración.

Las interneuronas GABAérgicas que se encuentran en el hipocampo tienen diferentes proyecciones y conexiones comparadas con la corteza cerebral. Datos de nuestra línea de investigación demuestran que la morfología de las interneuronas está relacionada con sus propiedades excitables (frecuencia de disparo, umbral, duración y amplitud de potencial de acción; Ascoli *et al.*, 2010) por lo que la morfología de estas interneuronas las puede hacer más sensibles a las modificaciones sinápticas del GABA en relación a las de la corteza cerebral.

### **¿Por qué es más excitable el hipocampo que la corteza cerebral para desarrollar un SAG?**

Las neuronas piramidales de la corteza cerebral y el hipocampo tienen discretas diferencias en sus propiedades excitables (umbral, disparo y adaptación): los potenciales de acción son discretamente más rápidos en el hipocampo que en la corteza (duración y amplitud), el post potencial hiperpolarizante (PPH) del potencial de acción de las neuronas hipocámpales tiene una mayor amplitud y está modulado por corrientes iónicas que las hacen *suigeneris* ( $I_{K^+}$  modulada por  $Ca^{2+}$  la cual las hace extraordinariamente sensibles en la excitabilidad; si esta corriente disminuye las neuronas son más excitables, como lo que sucede en muchos modelos de epilepsia. Nuestra línea de investigación indica que el SAG afecta estos PPH, los disminuye y en consecuencia las neuronas se hacen epilépticas). El SAG en su inducción en la Cx y el H tiene mecanismos semejantes pero estos son cuantitativamente más fuertes en el hipocampo porque las propiedades excitables de sus neuronas piramidales la morfología e integración sináptica de sus interneuronas las hace más excitables (Calixto *et al.*, 2008).

A nivel sináptico las neuronas del área CA1 del hipocampo tienen un receptor  $GABA_A$  predominante compuesto por las isoformas  $\alpha_{4,1,2} \beta_3 \gamma_2$ , en relación a las isoformas de la Cx  $\alpha_1 \beta_2 \gamma_2$  (Tabla. 1) esto le otorga una sensibilidad farmacológica distinta a estas dos áreas cerebrales, lo cual contribuye a la diferencia en la susceptibilidad para el desarrollo, expresión y duración del SAG. Datos previos en

nuestra línea investigación indican que los receptores del hipocampo en condiciones de una abstinencia a GABA *in vitro* tiene una *down regulation* permanente y que esta disminución en la densidad de receptores genera una plasticidad sináptica tendiente a la sincronización de poblaciones neuronales en el área CA1 del hipocampo (Casasola *et al.*, 2001). En contraste a este hallazgo en la Cx la *down regulation* durante el SAG es reversible por lo cual esta estructura muestra una mayor plasticidad del receptor GABA<sub>A</sub>, con una consecuencia inherente a esta tesis, que el fenómeno a nivel del receptor se auto limita más en la corteza cerebral que en el hipocampo.

Las entradas de la amígdala cerebral contribuyen a la excitabilidad del hipocampo, de igual forma la corteza entorrinal, la corteza frontal, la corteza temporal y los ganglios basales. Lo cual lo hace tener una reverberancia de información en ventanas de tiempo cortas. En relación con la corteza cerebral cuyas frecuencias de activación son distintas que aunque igual de dinámicas tienen menor frecuencia pero asocian ritmos con diversas estructuras como lo es el tálamo, el hipocampo, amígdala cerebral y núcleos subcorticales

Esta tesis propone que la organización, morfología celular y estructura diferencial de la corteza e hipocampo contribuyen de manera importante al aumento de la actividad GABAérgica, siendo el hipocampo claramente una estructura más epileptogénica con lo cual se acepta la hipótesis del trabajo y los objetivos propuestos para este punto.

### **Efecto de la hiperexcitabilidad neuronal del SAG en la memoria de reconocimiento de corto y largo plazo en la corteza cerebral y CA1 del hipocampo.**

En este trabajo una de las hipótesis planteó que el incremento de la excitabilidad neuronal puede favorecer el sustrato sináptico de la memoria y el aprendizaje. Tanto en hipocampo como en corteza la abstinencia a GABA favorece la LTP. Bajo esta premisa, nuestra propuesta fue identificar si el SAG modificaría la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo.

Estudios farmacológicos han demostrado que al realizar inyecciones post-entrenamiento de compuestos GABAérgicos modulan el almacenamiento de la memoria (Hatfield *et al.*, 1999). Bloquear al receptor GABA<sub>A</sub> mejora el rendimiento en tareas de memoria, en contraste, la administración de agonistas disminuyen su formación en roedores (Kim *et al.*, 2012). Por sus cambios sinápticos y electrofisiológicos, el SAG asemeja los efectos epileptiformes de la bicuculina. Los antecedentes indican que los receptores GABA<sub>A</sub> modulan los procesos post-entrenamiento que subyacen la consolidación de la memoria (Luft *et al.*, 2004).

Los datos obtenidos en esta tesis sugieren que la hiperexcitabilidad neuronal generada por la inducción de la abstinencia a GABA en la corteza cerebral o en el área CA1 del hipocampo no modifica la memoria de reconocimiento a corto y largo plazo.

Ennaceur y Delacour (1998) demostraron que cuando una rata tiene preferencia por el objeto novedoso recuerda que anteriormente estuvo expuesta a uno de los dos estímulos. Asimismo se ha reportado que el hipocampo es una estructura que está relacionada ampliamente con procesos de memoria (Moser y Moser, 1998). Los primeros estudios en donde se demostró que las lesiones en el lóbulo temporal provocaban daño amnésico, dieron una gran importancia al hipocampo, estudios posteriores demostraron que la memoria dependiente del hipocampo estaba ampliamente relacionada con la memoria del miedo y la espacial (Mishkin, 1978; Dix y Aggleton, 1999; Brown y Aggleton, 2001; Mumby et al., 2002; Darnaudery *et al.*, 2002; Manns *et al.*, 2003; Winters *et al.*, 2004; Aggleton *et al.*, 2005; Eichenbaum, Yonelinas, y Ranganath, 2007; Squire, Wixted, y Clark, 2007; Balderas *et al.*, 2008).

El hipocampo está relacionado con la posición de los objetos en el espacio o la información referente a estímulos en lugares específicos (Gaffan y Parker, 1996; Nemanic, Alvarado, y Bachevalier 2004; Mumby et al., 2002).

Broadbent *et al.*, (2004) demostró que una lesión en el hipocampo dorsal mayor a un 75% induce un déficit en la ejecución de reconocimiento de objetos. La conclusión de este trabajo fue que el hipocampo participa activamente en tareas espaciales las cuales requieren mayor integración del contexto (ambiente o espacio donde se desarrollan), en contraste, el hipocampo al parecer no participa

en tareas de reconocimiento (es decir en donde no requiere discriminar un ambiente específico; Mumby *et al.*, 2002).

Estos datos sugieren que el hipocampo tiene una participación significativa en la discriminación de estímulos en un ambiente específico.

La memoria de reconocimiento en contexto necesita de la síntesis de proteínas ya que la aplicación de un inhibidor selectivo de síntesis de *novo* altera la memoria de reconocimiento de objetos, pero no la memoria de reconocimiento (Balderas *et al.*, 2008; Balderas *et al.*, 2015).

Administrar DDC, un inhibidor selectivo y reversible de la sinapsis de las fibras musgosas y neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo no afecta la consolidación de la memoria de reconocimiento, pero esta región del hipocampo sí está implicada en el procesamiento de la información espacial: adquisición y consolidación; esta memoria espacial, es la responsable de que los animales discriminar el arreglo espacial novedoso (Stupien *et al.*, 2003). Tanto el área CA1 y CA3 tienen un procesamiento semejante: la memoria de reconocimiento no se altera por lesiones pero si la memoria de reconociendo en contexto.

Hay otras áreas cerebrales de activación importantes para la memoria de reconocimiento medidas a través de la actividad de c-fos (gen de expresión temprana que marca activación neuronal). Por ejemplo, (Wan *et al.*, 1999; Moses *et al.*, 2005; Aggleton y Brown, 2005) reportaron que existe una participación diferencial en algunas

estructuras del lóbulo temporal-medial posterior a la presentación de un estímulo novedoso o del arreglo espacial novedoso de estímulos familiares. La corteza perirrinial se activa selectivamente ante la presentación de un estímulo novedoso. En contraste el hipocampo se activa ante la exposición a estímulos novedosos de los arreglos espaciales. Winters *et al.*, (2004) fueron los primeros en demostrar que existe una doble disociación entre las estructuras del lóbulo temporal medial, ellos encontraron que las lesiones del hipocampo perjudican sólo la memoria espacial pero no afectan la memoria de reconocimiento.

Las evidencias indican que el hipocampo está implicado en el procesamiento de la información contextual (identificación de posición, espacio y estímulos de contexto específicos), pero no en la memoria de reconocimiento. Que es dependiente de la integridad anatómica, la síntesis de proteínas y actividad neuronal.

Pesé a que *in vitro* se había identificado que la hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia a GABA favorece los mecanismos sinápticos para el aprendizaje y la memoria, en la corteza cerebral y en el hipocampo, *in vivo* no se cuantificaron diferencias significativas en este fenómeno. El objetivo de este trabajo pretendía identificar si el incremento de la actividad neuronal por una abstinencia a GABA podría modificar la memoria de reconocimiento. Con base a los resultados obtenidos la hipótesis planteada no se acepta.



Es la primera vez que se realiza un análisis conductual, farmacológico y electrofisiológico sobre los efectos del SAG sobre la memoria de reconocimiento a corto o largo plazo. Estudios subsiguientes deberán evaluar si el SAG contribuye a otro tipo de memorias y la disociación que existe en las estructuras del lóbulo temporal. La hiperexcitabilidad neuronal de la corteza cerebral tampoco incide en esta memoria.

### **Neurobiología de la ansiedad durante el SAG**

Se ha demostrado que el GABA tiene un papel fundamental en la patogénesis de la ansiedad (Lydiard, 2003; Rudolph y Möhler, 2006; Sandford, Argyropoulos y Nutt, 2000). Paradójicamente los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de la ansiedad, son agonistas GABAérgicos como las benzodiazepinas y algunos esteroides. Nuestra línea de investigación reconoce que generar tolerancia y dependencia (Bz, alcohol y neuroesteroides) va relacionado con una disminución en el tono GABAérgico. Se sabe que la abstinencia induce cambios en la expresión en la subunidad del receptor GABA<sub>A</sub>, tolerancia y dependencia a neuroesteroides o Bz tiene el común denominador de disminuir la expresión de la subunidad  $\alpha 1$ , y  $\alpha 2$  asociado a una sobreexpresión de la subunidades  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  lo cual contribuye a una disminución de la afinidad del receptor por su agonista y una disminución en la actividad del GABA. La tolerancia y dependencia a diversas drogas GABAérgicas tienen un mecanismo en común, expresarse como ansiedad. Está se da por un incremento en su funcionamiento de

diversas estructuras corticales y subcorticales, lo cual únicamente puede ser inhibido por una re-exposición a un agonista del receptor GABA<sub>A</sub>. Estudios en animales que tienen un *knock-out* del gen para la expresión de la subunidad  $\alpha 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> presentan como marcador característico un incremento en la conducta tipo ansiosa (Möhler *et al.*, 2012; Kheirbek *et al.*, 2012; Shekhar *et al.*, 1990). Resultados preliminares de nuestra línea de investigación indican que durante el SAG hay una disminución en la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  y un incremento en la expresión  $\alpha 4$ , esto es semejante a lo que hacen otros agonistas del receptor. Por lo tanto se sugiere que uno de los inductores de la ansiedad en este modelo sea un cambio molecular. Investigaciones ulteriores tendrán que identificar los cambios cuantitativos en el hipocampo y la corteza cerebral, para identificar si contribuyen de la misma manera en la inducción de la conducta tipo ansiosa.

Se sabe que las regiones cerebrales que están implicadas con la generación, modulación y expresión de la conducta de ansiedad son: la amígdala cerebral, el hipocampo y la corteza prefrontal (Möhler, 2012; Clement y Chapouthier, 1997). Durante los primeros estadios de síndromes de abstinencia a diferentes drogas la conducta de ansiedad puede ser el resultado de cambios en la plasticidad neuronal.

Datos previos en nuestra línea de investigación demostraron que el SAG en la corteza somatomotora en los estadios iniciales presentaba una conducta de ansiedad acompañada por la aparición

de complejos espiga-onda en el EEG (Segovia, 2014). Es decir, que al presentarse una disminución de la actividad GABAérgica cerebral puede ponerse en manifiesto una conducta ansiosa (Picazo *et al.*, 2006; Fernández-Guasti y Picazo, 1999). La ansiedad es la manifestación clínica de la conducta del miedo, la cual se caracteriza por un estado de alerta continua ante un estímulo peligroso (Möhler, 2012). Este proceso implica una activación del sistema nervioso autónomo que permite un incremento del metabolismo, de la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria, disminución de la atención, asociado a un incremento de la sensibilidad sensorio-perceptiva (Clement y Chapouthier, 1997).

Uno de los objetivos de esta tesis fue cuantificar la conducta de ansiedad durante la abstinencia a GABA en el área CA1 del hipocampo y la corteza cerebral. Los resultados obtenidos demuestran que aunque el hipocampo sea una estructura más epileptogénica por su organización y su estructura, no presenta niveles mayores de ansiedad que los cuantificados en la corteza.

En conjunto estos resultados sugieren que el GABA es un mediador clave en la regulación de la ansiedad, que el SAG de la corteza y el SAG del hipocampo en sus estadios tempranos modifican la liberación de GABA y cambian la expresión de sus receptores y continua con cambios en la expresión y funcionamiento de los mismos, generando un perfil ansiogénico en los animales.

## **VII. Conclusiones**

1. El SAG del hipocampo tiene mayor duración, potencia y frecuencia EEG comparado con el SAG de la corteza.
2. La memoria a corto plazo no se modifica por la hiperexcitabilidad neuronal inducida por la abstinencia a GABA en la corteza cerebral y el área CA1 del hipocampo.
3. La memoria a largo plazo no se ve afectada por el SAG de la corteza cerebral y el SAG hipocampo.
4. El SAG Cx y El SAG H generan un perfil tipo ansioso pero no presentan diferencias significativas entre ellos.

### VIII. Referencias

- Abadie, P., Boulemger, J, p., Benali, K., Barrew, L., Zarifian, E, y Baron, J, C. (1999). Relationships between trait and state anxiety and the central benzodiazepine receptor: a PET study. *Eur J Neurosci*, 11, 1470-8
- Academia Nacional de Medicina (1999). Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1ª. Edición en Español, Academia Nacional de Medicina. México (DF).
- Aggleton JP, Vann SD, Denby C, Dix S, Mayes AR, et al. (2005). Sparing of the familiarity component of recognition memory in a patient with hippocampal pathology. *Neuropsychologia*. 43(12):1810–23.
- Aggleton J. P., Brown M. W. (2005). Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q. J. Exp. Psychol. B* 58, 218–233.
- Araneda, S., Silva-Barrat, C., Menini, C. y Naquet, R. (1994). High Expression of Noradrenaline, Choline Acetyltransferase and Glial Fibrillary Acid Protein in the Epileptic Focus Consecutive to GABA Withdrawal. An Immunocytochemical Study. *Brain Research*. 655(1-2): 135-146.
- Argyropoulos SV, Sandford JJ, Nutt D. (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 2. Pharmacological treatments of anxiety. *Pharmacol Ther*. 88:213–227.
- Ascoli, G. A., Gasparini, S., Medinilla, V., y Migliore, M. (2010). Local Control of Post inhibitory Rebound Spiking in CA1 Pyramidal Neuron Dendrites. *The Journal of Neuroscience*, 30(18), 6434–6442.

- Balderas, I., Ramírez-Amaya, Bermudez-Rattoni, (2004). 2004). Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Rev Neurol*; 38 810.: 944-948
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., & Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learning & Memory*, 15(9), 618–624.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C.J., y Bermudez-Rattoni, F. (2015). Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Behav. Brain Res*, 285:213–222
- Brailowsky, S. (1991). The GABA-Withdrawal Syndrome. *Proc West Pharmacol Soc*, 34: 227-228.
- Brailowsky, S., Montiel, T., Hernández, E., Marescaux, C. y Vergnes, M. (1992). Effects of 3-hydroxy, 3-ethyl,3-phenylpropionamide (HEPP) on Rat Models of Generalized and Focal Epilepsy. *Epilepsy Research*, 11:167-172.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., Riche, D. y Naquet, R. (1988). The GABA-Withdrawal Syndrome: a New Model of Focal Epileptogenesis. *BrainResearch*, 442: 175-179.
- Brailowsky, S, Silva-Barrat C, Menini C, Riche D et al. (1989) Effects of localized, chronic GABA infusions into different cortical areas of the photosensitive baboon, Papio Paio. *Electroencephalographic Clin Neurophysiol*, 72: 174-156.
- Brailowsky, S., Kunimoto, M., Menini, C., Silva-Barrat, C., et al. (1990) Electroencephalographic study of the GABA-Withdrawal syndrome in rats. *Epilepsy*; 31: 369-377.

- Brailowsky, S., Menini, C., Silva-Barrat, C. y Naquet, R. (1987). Epileptogenic Gamma-Aminobutyric Acid Withdrawal Syndrome after Chronic, Intracortical Infusion in Baboons. *Neuroscience Letters*, 74: 75-80.
- Belleli, D. y Lambert, J.J. (2005). Neurosteroids: Endogenous regulators of the GABA<sub>A</sub> receptors. *Nature reviews/Neuroscience*. (6):565-575.
- Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J. y Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA<sub>B</sub> receptors. *Physiol Rev*. 84:835-67.
- Brandon, C.D. y Fisher, J.L. (2006) Identification of structures within GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318:1094-101.
- Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40),
- Bormann J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 16–19.
- Brown M. W., Aggleton J. P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 51–61.
- Bowery, N. (1990). GABA Transporter Protein Cloned from de Rat Brain. *TIPS*, 11:435-437.
- Bowery, N.G., Bettler, B., Froestl, W., Gallagher, J.P., Marshall, F., Raiteri, .M., Bonner, T.L. y Enna, S.J. (2002). International Union of

- Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev.* 54:247-264.
- Bowery, N, Enna, S.J, Olsen, R.W. (2004) Six decades of GABA. *Biochem Pharmacol.* 68:1477–1478.
- Cabo de la Vega, C., Villanueva-Hernández, P. y Prieto-Martín, A. (2006) Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales, nuevas perspectivas. *Rev Neurol.* 42:159-168.
- Calixto, E., Montiel, T., Lemini, C. y Brailowsky, S. (1995). Allopregnanolone Potenciates a GABA-Withdrawal Syndrome in the Rat Cerebral Cortex. *Neuroscience Letters*, 195:73-76.
- Calixto, E., Galván, E. J., Card, J. P., y Barrionuevo, G. (2008). Coincidence detection of convergent perforant path and mossy fibre inputs by CA3 interneurons. *The Journal of Physiology*, 586(Pt 11), 2695–2712.
- Calixto, E. (2012). La abstinencia a GABA: 20 años de un modelo hiperexcitabilidad neuronal. *Salud Mental.* 35:427-434.
- Calixto, E. (2016). GABA withdrawal syndrome: GABAA receptor, synapse, neurobiological implications and analogies with other abstinences, *Neuroscience*, 313:57-72
- Calixto, E., López-Colomé, A.M., Casasola, C., Montiel, T., et al. (2000). Neocortical hyperexcitability alter GABA withdrawal in vitro. *Epilepsia*, 39:13-26.
- Carlson, N. (2006). Fisiología de la Conducta. México: Pearson, 120-140.
- Carter, R. (2001). El Cerebro Humano. México. D.R. Santillana, 152-162.



- Casasola C, Bargas J, Arias-Montano JA, Calixto E, Montiel T, Galarraga E, Brailowsky S. (2001). Hippocampal hyperexcitability induced by GABA withdrawal is due to down-regulation of GABA(A) receptors. *Epilepsy Res.*;47:257–271
- Casasola, C., Montiel, T., Calixto, E., Brailowsky, S. (2004). Hiperexcitability induced by GABA withdrawal facilitates hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience*,126:163-171.
- Clement, Y. y Chapouthier, G. (1997). Biological Bases of Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22: 623-633.
- Cortes-Romero, C., Galindo, F., Galicia-Isasmendi, S. y Flores, A. (2011). GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol*. 52(11):655-675.
- Cuzon Carlson, V. C., y Yeh, H. H. (2011). GABA<sub>A</sub> Receptor Subunit Profiles of Tangentially Migrating Neurons Derived From the Medial Ganglionic Eminence. *Cerebral Cortex (New York, NY)*, 21(8), 1792–1802.
- Crestani, F., Lorez, M., Baer., K., Essrich, C., Benke, D., Laurent, J.P., et al. (1999). Decreased GABA<sub>A</sub> -receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nat Neurosci* 2:833-839.
- Darnaudery, M, Pallarés M, Piazza, P,V, Le, Moal, M, Mayo, W.(2002).The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the medial septum nucleus increases hippocampal acetylcholine and spatial memory in rats. *Brain Res*. 951: 237-42.
- de Lima MN, Luft T, Roesler R, Schroder N. (2006). Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett*. 405:142–146.

- Dix SL, Aggleton J.P. (1999). Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behav Brain Res.* 99(2):191–20
- Eichenbaum H., Yonelinas A. P., & Ranganath C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 123–152.
- Ennaceur A., Delacour J. (1998). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31:47–59.
- Feng, H.J. (2010). Allosteric modulation of  $\alpha\beta\delta$  GABA<sub>A</sub> receptors, *Pharmaceuticals*.3:3461–3477.
- Fernández- Guasti, A. y Picazo, O. (1999). Sexual Differentiation Modifies the Allopregnanolone Anxiolytic Actions in Rats. *Psychoneuroendocrinology*, 24: 251-267.
- Fernández-Mas, R., Valdés, A., Martínez, A., Magdaleno, V., Almazán, S., Martínez, D. y Fernández-Guardiola, A. (1998). Visualización Gráfica de las Transiciones del Sueño en el Hombre: Métodos de Representación Tridimensional. *Salud Mental*, 6:27-32.
- Filip, M, Frankowska, M, Sadakierska-Chudy, A, Suder A, Szumiec, L, Mierzejewski P, et al. (2015). GABAB receptors as a therapeutic strategy in substance use disorders: focus on positive allosteric modulators. *Neuropharmacology*, 88:36-47.
- Fisher, J.L. (2004). A mutation in the GABAA receptor alpha 1 subunit linked to human epilepsy affects channel gating properties. *Neuropharmacology* 46:629–637

- Franks, N.P. y Lieb, W.R. (1994). Molecular and Cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. 367:607-14.
- Foster, A.C. y Kemp, J.a. (2006). Glutamate and GABA based CNS Therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 6:7-17.
- Gaffan D., Parker A. (1996). Interaction of perirhinal cortex with the fornix-fimbria: Memory for objects and “object-in-place” memory. *J. Neurosci* ;16:5864–5869
- Gasbarri, A., Pompili, A. (2014). 3-The Role of GABA in Memory Processes. Identification of Neural Markers Accompanying Memory. Meneses, A.(Ed). Elsevier, San Diego, 47-62–239.
- Hatfield T., McGaugh J. L. (1999). Norepinephrine infused into the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 71, 232–239
- Heaney, C. F. Kinney, J.W. (2016). Role of GABAB receptors in learning and memory and neurological disorders, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 63: 1-28
- Hernández, A. (2013). La hiperexcitabilidad neuronal de la abstinencia a GABA produce modificaciones conductuales en la rata hembra. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Hines, R.M, Davies, PA, Moss. SJ, Maguire J. (2012).Functional regulation of GABAA receptors in nervous system pathologies. *Curr Opin Neurobiol*, 22: 552–8.
- Jacob, T.C, Michels, G, Silayeva, L, Haydon, J, Succol, F, Moss, S.J. (2012). Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in

- GABAA receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(45).
- Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5): 331-343.
- Jorgensen E, M. (2005). GABA. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*. Pasadena (CA).
- Kandel, E.R., Schwartz, J, H., Jessel, T, M. (2000). *Principles of Neural Science*. 4<sup>th</sup>. Edition, McGraw-Hill
- Kandel, E.R. (2001). The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*. 294: 1030-1038
- Kalueff, A. V. (2007). Neurobiology of Memory and Anxiety: From Genes to Behavior. *Neural Plasticity*. 778171
- Kalueff, A. y Nutt, D.J. (1997). Role of GABA in memory and anxiety. *Depress Anxiety* 4:100-110.
- Katsura, M., Shibasaki, M., Kurokawa, K., Tsujimura, A. y Ohkuma, S. (2007). Upregulation of L-type High Voltage-gated Calcium Channel Subunits by Sustained Exposure to 1,4- and 1,5-benzodiazepines in Cerebrocortical Neurons. *Journal of Andrology*, 29:524-532.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Archives of general psychiatry*. ;62:593–602.
- Kim, D.H, Kim, J.M, Park, S,J, Cai, M, Liu,X, Lee S, Shin CY, Ryu JH. (2012). GABA receptor blockade enhances memory consolidation by

- increasing hippocampal BDNF levels. *Neuropsychopharmacology*. 37:422-433.
- Kheirbek, MA, Klemenhagen, KC, Sahay, A., y Hen, R. (2012). Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. *Nature Neuroscience* , 15 (12),1613.
- Lagrange, A. H., Botzolakis, E. J., Macdonald, R.L. (2007). Enhanced macroscopic desensitization shapes the response of alpha4 subtype-containing GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic GABA. *J Physiol* 578:655–676.
- Lin, L.H., Chen, L.L., Zirrolli, J.A. y Harris, R.A. (1992). General anesthetics potentiate gamma-aminobutyric acid actions on gamma-aminobutyric acid A receptors expressed by *Xenopus* oocytes: lack of involvement of intracellular calcium. *J.Pharmacol Exp Ther.* 263:569-78.
- Luft T., Pereira G. S., Cammarota M., Izquierdo I. (2004). Different time course for the memory facilitating effect of bicuculline in hippocampus, entorhinal cortex, and posterior parietal cortex of rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82, 52–56
- Luscher, B., Shen, Q. y Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 16:383-406.
- Lydiard, R.B. (2003). The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry.* 64:21–27.
- Magnaghi, V. (2007). GABA and Neuroactive Steroid Interactions in Glia: New Roles for Old Players? *Current Neuropharmacology.* 5(1), 47–64.
- Mandler, G. (1980). Recognizing: The judgment of previous occurrence. *Psychological Review*, 87, 252–271.

- Manns J. R., Hopkins R. O., Reed J. M., Kitchener E. G., Squire L. R. (2003). Recognition memory and the human hippocampus. *Neuron*. 37, 171-180.
- Maren, S. & Quirk, G. J. (2004). Neuronal signalling of fear memory. *Nature Rev. Neuroscience* . 5,844–852
- Macdonald, R. L., Kang, J.-Q., y Gallagher, M. J. (2010). Mutations in GABA<sub>A</sub> receptor subunits associated with genetic epilepsies. *The Journal of Physiology*, 588(11), 1861–1869.
- McGaugh JL, Roozendaal B. (2009). Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. *Psychopharmacology*, 202:3–14.
- Mendoza, N. (2008). *Farmacología Médica*. México: Panamericana. Pp. 272-276.
- Menini, C., Mraovitch, S., Calando, Y., De la Sayette, V., et al. (1991). Metabolic anatomy of the focal epilepsy produced by cessation of chronic intracortical GABA infusions in the rat. *Neuroscience*. 41:607-615.
- Miguel, A. (2012). *Administración Crónica de Dz como Promotor de Conductas Adictivas a Drogas en la Edad Adulta de la Rata*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Millan MJ. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol*. 70: 83–244.
- Mishkin M. (1978). Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 273, 297–298.

- Montiel, T., Almeida, D., Rango, I., Calixto, E., Cassasola, C. y Brailowsky, S. (2000). Long-Lasting effects of GABA infusión into the cerebral cortex of the rat. *Neuroplasticity*. 7: 1-2
- Möhler, H. (2012) The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology* 62:42-53.
- Moser M., Moser E. I. (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 7535–7542.
- Moses SN, Sutherland RJ, McDonald RJ. (2002). Differential involvement of amygdala and hippocampus in responding to novel objects and contexts. *Brain Res Bull.* 2002;58:517–527.
- Moses S. N., Cole C., Driscoll I., Ryan J. D. (2005). Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Res. Bull.* 67, 62–76.
- Mumby, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learning & Memory*, 9(2), 49–57.
- Mumby D. G., Tremblay A., Lecluse V., & Lehman H. (2005). Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention delays. *Hippocampus*, 15, 1050–1056.
- Murray W.A., Richmond B.J. (2001). Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Current Opinion in Neurobiology*. 11:188–193.

- Nash, J., Nutt, D. (2007). Psychopharmacology of anxiety. *Psychiatry*, 6(4): 143-148.
- Nazari, M, Karamian, A, Shahidi, R, Sarihi, S, Asadbegi, M. (2016). The interactive role of CB1 and GABAB receptors in hippocampal synaptic plasticity in rats. *Brain Research*, 120: 123-130.
- Nelson, H., Mandiyan, S. y Nelson, N. (1990). Cloning of the Human Brain GABA Transporter. *FEEBS Lett* 269: 181-184.
- Nemanic, S., Alvarado, M.c., Bachevalier, J. (2004). The hippocampal/parahippocampal regions and recognition memory: insights from visual paired comparison versus object-delayed nonmatching in monkeys. *J. Neurosci.* 24:2013–26.
- Norrholm, S. D., & Ressler, K. J. (2009). Genetics of Anxiety and Trauma-Related Disorders. *Neurociencia*, 164(1) 272-287
- Nutt, D.J. y Malizia, A.L. (2001). New insights into the role of the GABA<sub>A</sub> receptor in psychiatric disorders. *Brit J. Psychiatry*. 179:390-396.
- Olivares, J, D., Juárez, E., García, F. (2015). El hipocampo: Neurogénesis y aprendizaje. *Rev Med UV*, México
- Olsen, R. (2000). GABA is the Major Inhibitory Neurotransmitter in the Nervous System. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, 12: 159-168.
- Olsen R,W. Betz, H. (2006). GABA and glycine. Siegel, G, J., Arganoff, B, W., Albers, R, W., Fisher, S, K., Uhler, M, D. (Eds). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Academic Press, New York. NY. 291-301.



- O'Reilly R. C. & Rudy J. W. (2001). Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function. *Psychol. Rev.* 108, 311–345
- Paxinos, G. y Watsonm, C. (1998). The rat btain in stereotaxic coordinates. Academic Press. 20-39.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. y Briley, M. (1985). Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neurosci Methods*, 14: 149-167.
- Picazo O, Estrada-Camarena E, Hernandez-Aragon A. (2006). Influence of the post-ovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *Eur J Pharmacol.* 530:88–94.
- Pimentel, A.K. (2013). Evaluación de la conducta sexual, de ansiedad y de depresión durante el síndrome de abstinencia a GABA en la rata macho. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Pin, J. P. *et al.* (2004). Activation mechanism of the heterodimeric GABA(B) receptor. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1565–1572.
- Pinard, A., Seddik, R., Bettler B. (2010). GABAB receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Adv. Pharmacol.* 58, 231–255.
- Pirker S., Schwarzer C., Czech T., Baumgartner C., Pockberger H., Maier H., Hauer B., Sieghart W., Frittinger S., Sperk G. (2003). Increased expression of GABA<sub>A</sub> receptor beta-subunits in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62:820–834.

- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O. y Williams, S.M. (2006). *Neurociencia*. México: Panamericana. Pp. 156-160.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., Lamantia, A.S., McNamara, J.O. y Williams, S.M. (2007). *Neuroscience*. Sinauer Associates: Sunderland, MA. Pp. 133-137.
- Reed, J. M., & Squire, L. R. (1997). Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behavioral Neuroscience*, 111, 667-675
- Reddy. D. S. (2003). Is there a physiological role for the neurosteroid THDOC in stress-sensitive conditions?. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 103–106.
- Rodgers, R.J. y Dalvi, A. (1997). Anxiety, Defense and the Elevated Plus-Maze. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 21(6):801-10.
- Rudolph U., Möhler H. (2004)..Analysis of GABA<sub>A</sub> receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44:475–498.
- Rudolph, U. Möhler, H. (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABA<sub>A</sub> receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6:18–23.
- Saari, T.I, Uusi-Oukari. M, Ahonen, J, Olkkola K. (2011). Enhancement of GABAergic activity: neuropharmacological effects of benzodiazepines and therapeutic use in anesthesiology. *Pharmacol Rev.* 63(1):243–67.

- Salazar, P., Montiel, T., Brailowsky, S. & Tapia, R. (1994). Decrease of glutamate decarboxylase activity after in vivo cortical infusión of gamma-amino butyric acid. *Neurochem Int.* 24: 363-368.
- Sandford JJ, Argyropoulos SV, Nutt DJ. (2000). The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacol Ther.* 3:197–212.
- Scharfman, H. E., Brooks-Kayal, A, R. (2014). Is plasticity of GABAergic mechanisms relevant to epileptogenesis?. *Adv. Exp. Med. Biol.* 813:133–150
- Schousboe, A. Waagepetersen, H.S. (2007). GABA: homeostatic and pharmacological aspects. *Prog. Brain Res.*, 160, 9–19.
- Schousboe, A. Waagepetersen, H.S. (2008). GABA neurotransmission: an overview. Lajtha, A. (Ed). *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer, New York, NY. 213-226.
- Segovia, M. (2014). La progesterona y el DL-DI-CF<sub>3</sub> HEPP reducen la hiperexcitabilidad neuronal del síndrome de abstinencia a GABA (SAG). Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Psicología, UNAM, Ciudad de México, México.
- Sigel, E, Steinmann, M.E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J Biol Chem.* 287: 40224–40231.
- Siegelbaum S., Kandel E.R. (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1, 113–120.
- Sieghart, W. (1995). Structure and pharmacology of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 47:181-234.

- Shekhar A, Hingtgen JN, DiMicco JA.(1990): GABA receptors in the posterior hypothalamus regulate experimental anxiety in rats. *Brain Res.*;512:81–88
- Silva-Barrat, C., Araneda, S., Menini, C., Champagnat, J. y Naquet, R. (1992). Burst Generation in Neocortical Neurons after GABA Withdrawal in The Rat. *J Neurophysiol* 67: 715-727.
- Silva-Barrat C, Velluti J, Szente M, Batini C, Champagnat J. (2005). Exaggeration of Epileptic-Like Patterns by Nicotine Receptor Activation during the GABA Withdrawal Syndrome. *Brain Res.* 1042(2): 133-143.
- Silva-Barrat, C. Szente, M., Menini, C., Velluti, J. C. y Champagnat, J. A. (2001). Muscarinic Depression of Synaptic Transmission in the Epileptogenic GABA Withdrawal Syndrome Focus. *J Neurophysiol.* 85: 2159-2165
- Silva-Barrat, C. y Champagnat, J. A. (1995). Potassium Current Controls Burst Termination in Rat Neocortical Neurons after GABA Withdrawal. *Neurosci. Lett.* 189(2): 105-108.
- Smith, S.S. y Rudolph, U. (2012). Anxiety and depression: mouse genetics and pharmacological approaches to the role of GABA(A) receptor subtypes. *Neuropharmacology.* 62: 54-62.
- Solís, H., López-Hernández E. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Arch Neurocién (Mex)*. Vol. 14, No. 3: 176-187
- Squire, L. R., Zola-Morgan, J. T., & Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews. Neuroscience*,8(11), 872–883.

- Stupien G., Florian C., & Rouillet P. (2003). Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 32–41.
- Turkmen, S, Backstrom, T, Wahlstrom, G, Andreen L, Johansson I.M. (2011). Tolerance to allopregnanolone with focus on the GABA-A receptor. *Br J Pharmacol*. 162:311–327.
- Uusi-Oukari, M, Korpi, E.R. (2010). Regulation of GABA<sub>A</sub> receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev* 62(1):97–135.
- Waagepetersen, H.S. Sonnewald U., Larsson O. M., Schousboe A. (2001). Multiple compartments with different metabolic characteristics are involved in biosynthesis of intracellular and released glutamine and citrate in astrocytes. *Glia*. 35(3):246-52.
- Wall, P. M., and Messier, C. (2000). Concurrent modulation of anxiety and memory. *Behav. Brain Res*. 109, 229–241.
- Wan H, Aggleton JP, Brown M.W.(1999): Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J. Neurosci*. 19:1142–48.
- Wang, M. (2011). Neurosteroids and GABA-A Receptor Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*.2:44.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., y Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int. Rev. Cytol*. 213, 1–47.
- Will, B., Tonilo, G. y Brailowsky, S. (1988). Unilateral Infusion of GABA and Saline into the Nucleus Basalis of Rats: 1. Effects on Motor function and Brain Morphology. *Behavioural Brain Research*. 27: 123- 129.

- Winters B. D., Forwood S. E., Cowell R., Saksida L. M., & Bussey T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience*, 24, 5901–5908.
- Wolff J,R. (1981). Evidence for a dual role of GABA as synaptic transmitter and promoter of synaptogenesis. *Advances in biochemical psychopharmacology*. 29; 459-466.
- Yonelinas, A. P. (2002). The nature of recollection and familiarity: A review of 30 years of research. *Journal of Memory and Language*, 46, 441–517.