



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Análisis comparativo de la expresión de c-Fos en el hipotálamo y la  
amígdala de ratas con tolerancia farmacológica y asociativa a efectos  
ansiolíticos de midazolam y flumazenil**

**Tesis para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista**

P r e s e n t a

**Cibel Estrada Barrón**

Directora de Tesis:

Dra. Sara Eugenia Cruz Morales

Asesora:

Dra. Carolina Morán Raya



El Salado, Tecamachalco, Puebla. Mayo 2015

## **Agradecimientos**

Este trabajo es un resultado parcial del Proyecto de investigación “Análisis de la expresión de c-fos en diversas regiones cerebrales en ratas con tolerancia farmacológica y asociativa a los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas” apoyado por la UNAM, DGAPA, PAPIIT IN307711, Responsable Dra. Sara Eugenia Cruz Morales, UNAM-FES-Iztacala, el proyecto se realizó en colaboración con la Dra. Carolina Moran Raya, BUAP. Agradezco a DGAPA, UNAM la Beca que me otorgó para la realización de la Tesis.

Este trabajo de Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Este trabajo me ha permitido aprovechar la competencia y la experiencia de muchas personas que deseo agradecer en este trabajo.

En primer lugar a mi directora de Tesis, Dra. Sara Eugenia Cruz Morales, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo en persona, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo.

A mi asesora, Dra. Carolina Moran Raya, un especial agradecimiento primero por haberme recibido en su grupo de investigación en el Depto. Biología y Toxicología de la Reproducción, segundo, por sus consejos y su gran sabiduría y paciencia, apoyo y ánimo que me brindó durante mi estancia donde he podido tener la oportunidad de aprender y acabar una parte de este trabajo.

Mis agradecimientos a la colaboración del equipo involucrado en la toma, procesado de las muestras y el análisis, que hicieron posible la realización de esta Tesis. Desde luego, mis agradecimientos a Daniel Jerónimo G.S., por el espíritu de grupo, paciencia y por el incondicional apoyo durante estos años de trabajo.

Todos mis compañeros y amigos, estén donde estén, y sin excepción. Por todo el tiempo que me han dado, por las conversaciones científicas de las que tanto provecho he sacado, por el respaldo y la amistad. Gracias.

## **Dedicatorias**

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional que me otorgo y el cariño que me inspiró mi madre, que, de forma incondicional, entendió mis ausencias y mis malos momentos, por darme la confianza y el apoyo brindado, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi pequeña hija AlyhaaXitzenamy por ser una razón para seguir luchando y nunca caer, tu afecto y cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. Aun a tu corta edad, me ha enseñado y me sigues enseñando muchas cosas de esta vida. Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida. Fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito este proyecto de tesis.

A mi novio Pablo Armando C. M., por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos que además ha sido fiel amigo y compañero, que me ha ayudado a continuar, haciéndome vivir los mejores momentos de mi vida. Gracias a ti, por tu cariño y comprensión, porque sé que siempre contaré contigo.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

*“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada”*

Karl Popper

## Abreviaturas

3V: Tercer Ventrículo

5-HT: Serotonina

AHC: Área Hipotalámica anterior, central

AR: Núcleo Arcuato

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

B: Contexto Bioterio

BZD: Benzodicepinas

CeA: Amígdala Central

c-Fos: Proto-oncogen celular

CSB: Crónico salino Bioterio

CSL: Crónico Salino Laboratorio

DA: Dopamina

DMD: Núcleo Hipotalámico Dorsomedial

F: Flumazenil

GABA: Ácido Gamma-aminobutírico

i.p.: intra peritonealmente

kg: kilogramos

L: Contexto Laboratorio

LaDL: Núcleo Amigdalino Lateral, Dorsolateral

LaVL: Núcleo Amigdalino Lateral, Ventrolateral

LaVM: Núcleo Amigdalino Lateral, Ventromedial

LEC: Laberinto Elevado en Cruz

CB: Cuerpos Mamilares

ME: Eminencia Media

MeA: Amígdala Medial

MePD: Núcleo Amigdalino Medial, Postero Dorsal

MePV: Núcleo Amigdalino Medial, Postero Ventral

Mg: Miligramos

MN: Núcleo Medial

M: Midazolam  
MB: Midazolam Bioterio  
ML: Midazolam Laberinto  
NA: Noradrenalina  
NSQ: Núcleo Supraquiasmático  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PBS: Buffer de Fosfato Salino  
PBT: PBS +Tritón al 0.3%  
PHN: Núcleo Hipotalámico Posterior  
PaV: Núcleo Hipotalámico Paraventricular  
POA: Área Pre óptica  
PVN: Núcleo Paraventricular  
QO: Quiasma Óptico  
SNC: Sistema Nervios Central  
SO: Núcleo Supra óptico  
TBA: Tiempo en Brazo Abierto  
TRH: Vía Retino Hipotalámica  
VMN: Núcleo Ventromedial  
AP-1: Proteína activadora 1  
CL: Cloro  
Ss: Solución salina  
C: Grupo control  
S: Salina  
EBA: Entrada Brazos abiertos  
TBA: Tiempo Brazos abiertos  
p. ej: Por ejemplo

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>2. REVISION BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 Ansiedad.....	4
2.1.1 Definición.....	4
2.2 Trastornos por ansiedad y sistema límbico.....	6
2.2.1 Hipotálamo.....	8
2.2.1.1 Núcleos del hipotálamo.....	8
2.2.2 Amígdala.....	10
2.2.3 Conexiones entre los núcleos del hipotálamo y la amígdala.....	12
2.2.4 Modelos de ansiedad en animales.....	13
2.3 Benzodiacepinas.....	14
2.3.1 Historia.....	15
2.3.2 Adicción a Benzodiacepinas.....	15
2.3.3 Farmacocinética.....	17
2.3.3.1 Absorción.....	17
2.3.3.2 Distribución.....	18
2.3.4 Farmacodinamia.....	19
2.3.5 Tolerancia a Benzodiacepinas.....	24
2.3.6 Tipos de tolerancia.....	25
2.4 Midazolam y Flumazenil.....	27
2.5 Factores de transcripción de la familia AP-1.....	28
2.5.1 Generalidades.....	28
2.5.2 c-Fos.....	29
2.5.3 Marcador de actividad neuronal.....	30
<b>3. JUSTIFICACION</b> .....	31
<b>4. HIPOTESIS</b> .....	33
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b> .....	34

5.1 Objetivo específico.....	34
5.2 Estrategia experimental.....	35
<b>6. MATERIALES.....</b>	<b>36</b>
<b>7. METODOS.....</b>	<b>38</b>
7.1 Análisis estadístico.....	43
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>9. DISCUSION .....</b>	<b>57</b>
<b>10. CONCLUSION.....</b>	<b>60</b>

## INDICE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> .....	6
<b>Fig. 2</b> .....	7
<b>Fig. 3</b> .....	9
<b>Fig. 4</b> .....	11
<b>Fig. 5</b> .....	12
<b>Fig. 6</b> .....	21
<b>Fig. 7</b> .....	22
<b>Fig. 8</b> .....	23
<b>Fig. 9</b> .....	36
<b>Fig. 10</b> .....	41
<b>Fig. 11</b> .....	44
<b>Fig. 12</b> .....	45
<b>Fig. 13</b> .....	46
<b>Fig. 14</b> .....	47
<b>Fig. 15</b> .....	48
<b>Fig. 16</b> .....	50
<b>Fig. 17</b> .....	55
<b>Fig. 18</b> .....	55
<b>Fig. 19</b> .....	56
<b>Fig. 20</b> .....	56

## RESUMEN

Las benzodiazepinas (BZD) son las drogas más prescritas en el tratamiento de la ansiedad. El uso repetido de estas sustancias produce tolerancia y dependencia física y psicológica, por lo que existen problemas para suspender el tratamiento prolongado. La administración de fármacos asociados a ciertos estímulos (contexto) da lugar al desarrollo de tolerancia asociativa, hay datos que apoyan que la tolerancia farmacológica a las BZD se debe a cambios farmacodinámicos en el sistema límbico, áreas en que se encuentran los receptores a benzodiazepinas (receptores GABA<sub>A</sub>). Se ha demostrado que la tolerancia se desarrolla diferencialmente dependiendo del contexto ambiental, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes contextos en el desarrollo de la tolerancia y abstinencia al efecto ansiolítico de midazolam (M), adicionalmente se evaluó el efecto de flumazenil un antagonista de las BZD y la expresión de c-fos en hipotálamo y amígdala los cuales participan tanto en el procesamiento de los fenómenos agudos de recompensa que activan las drogas de abuso, como en las neuro adaptaciones asociadas a la administración crónica de dichas drogas. Se emplearon 45 ratas Wistar macho adultas las cuales se sometieron a dos diferentes ambientes cada uno con 4 diferentes protocolos de administración de midazolam: agudo, crónico, abstinencia y la interacción con el antagonista flumazenil para evaluar la ansiedad en el laberinto elevado e cruz. (LEC). El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos de la administración de M evaluando los efectos por la administración aguda y crónica (para estudiar tolerancia y abstinencia) y de la administración de flumazenil (antagonista de las BZD) en sujetos expuestos a LEC.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La ansiedad se refiere a una sensación desagradable de intranquilidad que experimenta un individuo en ciertas ocasiones en donde percibe que puede ocurrir algo inesperado y malo que pueda atentar contra su integridad física o psicológica. A diferencia del miedo, en la ansiedad el estímulo amenazante no está presente, pero existe la misma sensación anticipatoria del peligro.

En los trastornos por ansiedad participan algunas de las estructuras cerebrales que conforman el sistema límbico como el hipotálamo y la amígdala. El hipotálamo es una estructura fundamental que prepara al organismo para actuar ante situaciones que impliquen un sobre esfuerzo ante demandas ambientales. La amígdala cumple una importante función en la mediación y control de las actividades afectivas más importantes como la amistad, amor y afecto, en la expresión de los estados de ánimo, miedo, ira y agresión. La amígdala, al ser el centro de la identificación de peligro, es fundamental para la supervivencia. En los seres humanos y otros animales está ligada a respuestas tanto de miedo como de placer. Diferentes condiciones, como la ansiedad, el autismo, la depresión, la narcolepsia, el trastorno por estrés postraumático, las fobias y la esquizofrenia, están ligadas con un funcionamiento anormal de la amígdala debido a una lesión, trastornos del desarrollo o un desequilibrio de distintos neurotransmisores.

Las BZD continúan siendo los fármacos de elección para el tratamiento de los desórdenes de la ansiedad y el insomnio. Las benzodiazepinas son medicamentos psicotrópicos que afectan el SNC y producen efectos sedantes e hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y relajantes musculares), es por ello que son usados en medicina para la terapia de la ansiedad, insomnio y otros estados afectivos. El uso y prescripción de las BZD se ha relacionado con un alto riesgo de abuso y dependencia debido a su manejo inadecuado ya que, aun administradas regularmente a niveles terapéuticos, poseen un potencial de dependencia mayor que otros fármacos de acción ansiolítica.

El sitio de unión específico a las BZD en el receptor  $GABA_A$  es llamado sitio de unión benzodiazepínico las cuales potencian el efecto del neurotransmisor GABA sobre sus receptores ionotrópicos, lo que permite una mayor entrada del ion cloro a las neuronas favoreciendo la hiperpolarización de su potencial de membrana; la neurona se vuelve menos susceptible a los estímulos activadores (menos excitable) y se produce un estado de inhibición neuronal.

La tolerancia farmacológica y asociativa a las BZD se debe primordialmente a cambios farmacodinámicos en el sistema límbico, áreas en que se encuentran distribuidos los receptores a benzodiazepinas (receptores  $GABA_A$ ); dado que la tolerancia se desarrolla diferencialmente dependiendo del contexto en que administre.

El M tiene una vida media que oscila dentro de un rango que va de 1 a 4 horas, los efectos de la sobredosis (y otras BZD) pueden ser controlados con F el cual es una imidazobenzodiazepina que bloquea los efectos centrales de las benzodiazepinas por interacción competitiva a nivel del receptor. Por lo tanto es un antagonista de las benzodiazepinas indicado para revertir los efectos centrales (la sedación, debilitación de la memoria, disminución de actividad psicomotora y depresión ventilatoria) de estos medicamentos.

La expresión del gen de c-Fos es inducida de manera rápida y transitoria en células de mamífero ante una gran cantidad de estímulos y de esta manera es como se ha usado como marcador neuronal, tiene varias ventajas metodológicas y experimentales, ya que es expresado a bajos niveles en el cerebro intacto bajo condiciones basales, además es inducido fácilmente por varias señales extracelulares o estímulos.

---

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ansiedad

#### 2.1.1 Definición

La ansiedad se refiere a una sensación desagradable de intranquilidad que experimenta un individuo en ciertas ocasiones en donde percibe que puede ocurrir algo inesperado y malo que pueda atentar contra su integridad física o psicológica. La ansiedad se considera patológica cuando persiste durante un tiempo excesivamente prolongado o cuando alcanza una intensidad demasiado alta al punto que ocasione en el individuo la sensación de que no puede controlarse o que le produzca síntomas físicos importantes (Zoch, 1996). La ansiedad moviliza las operaciones defensivas del organismo, es base para el aprendizaje, estimula el desarrollo de la personalidad, motiva el logro de metas y contribuye a mantener un elevado nivel de trabajo y conducta. En exceso, la ansiedad es nociva, mal adaptativa, compromete la eficacia y conduce a las enfermedades (Reyes, 1984)

La ansiedad está presente en nuestras vivencias diarias y desempeña un papel importante en la adaptación y defensa ante situaciones de tensión o amenaza. Existe un nivel de ansiedad que se considera normal e incluso útil, se le denomina *umbral emocional* y permite mejorar el rendimiento y la actividad. Sin embargo, cuando la ansiedad rebasa ciertos límites, aparece un deterioro de la actividad cotidiana. En este caso, a mayor ansiedad, habrá un menor rendimiento. Sea el caso de un expositor ubicado frente a un público abundante, la activación de su *umbral emocional* puede inducirle a un mejor desempeño. Por el contrario, si la activación es excesiva, la ansiedad actuará de manera contraproducente al interferir con las actividades en forma negativa, lo que constituye el punto de partida para los trastornos por ansiedad. Los procesos cerebrales subyacentes al proceso ansioso son parcialmente conocidos y la mayor parte de este conocimiento se ha obtenido mediante el estudio de las acciones de los tratamientos ansiolíticos (Rodríguez & Contreras, 1998).

El enfoque evolutivo de la ansiedad humana se basa en las respuestas de defensa que los animales muestran ante estímulos que provocan miedo. Estudios llevados a cabo sobre todo en roedores, muestran que hay áreas del sistema nervioso central relacionadas; como la corteza medial pre frontal, la amígdala, núcleos hipotalámicos, hipocampo y cerebro medio gris. Es claro, sin embargo, que los animales muestran diferentes y a veces respuestas opuestas de acuerdo al estímulo amenazante. Estas respuestas son reacciones inmediatas, tales como la congelación o la huida, la inhibición o la evitación conductual, que se organizan por lo menos parcialmente distintos sistemas cerebrales. Varias piezas de evidencia indican que estos sistemas cerebrales son similares en roedores y primates. Además, los estudios de neuro imagen, recientes, también sugieren que las disfunciones en estos sistemas están probablemente relacionados con los trastornos de ansiedad en los seres humanos (Canteras *et al.*,2009).

A diferencia del miedo, en la ansiedad el estímulo amenazante no está presente, pero existe la misma sensación anticipatoria del peligro. Se supone que el miedo y la ansiedad no están gobernados exactamente por los mismos circuitos. Investigaciones en ratas arrojaron que la reacción ante estímulos concretos, como luces y sonidos (modelo del miedo) activa el núcleo central de la amígdala, que a su vez activa distintas áreas del hipotálamo y tronco cerebral, relacionados con el circuito del miedo (Halsban,2000).

Los trastornos por ansiedad son frecuentes y su presencia tiende a incrementarse debido a factores estresantes ambientales y a los problemas socioeconómicos actuales (Landázuri, 1989), estos trastornos afectan entre el 5 y 10 % de la población general (Eaton, 1995). En algunos casos los tratamientos farmacológicos son ineficaces. La ansiedad puede afectar a cualquier persona, es más frecuente en las mujeres que en los hombres (3:1), se caracteriza por una variada sintomatología. Llegan a producir incapacidad y a menudo se complican por el abuso de sustancias adictivas, incluso de los ansiolíticos (Eaton, 1995).

Los tratamientos farmacológicos actuales son eficaces en el control de la ansiedad, sin embargo, con frecuencia ejercen efectos colaterales que impiden su uso prolongado, lo que en el desarrollo de la dependencia que suele aparecer aún con el uso de dosis terapéuticas, así como a los costos elevados, genera la necesidad de realizar investigaciones sobre el sustrato anatómo-fisiológico de estos trastornos y a buscar alternativas en el

manejo terapéutico, ya que los trastornos por ansiedad al cabo del tiempo pueden desembocar en cuadros de depresión mayor, lo que conlleva el riesgo de suicidio (Angst *et al.*, 1990).

## 2.2 Trastornos por ansiedad y sistema límbico

En los trastornos por ansiedad participan algunas de las estructuras cerebrales que conforman el sistema límbico (Fig. 1), y es ahí en donde se ha observado que los fármacos ansiolíticos ejercen algunas de sus acciones (Treit *et al.*, 1981). El sistema límbico es el responsable de las emociones y de las estrategias asociadas a la sobrevivencia. Entre estas emociones se encuentran: el miedo, la furia, las sensaciones ligadas al sexo o al placer, también al dolor y a la angustia (Brailowsky, 2008).

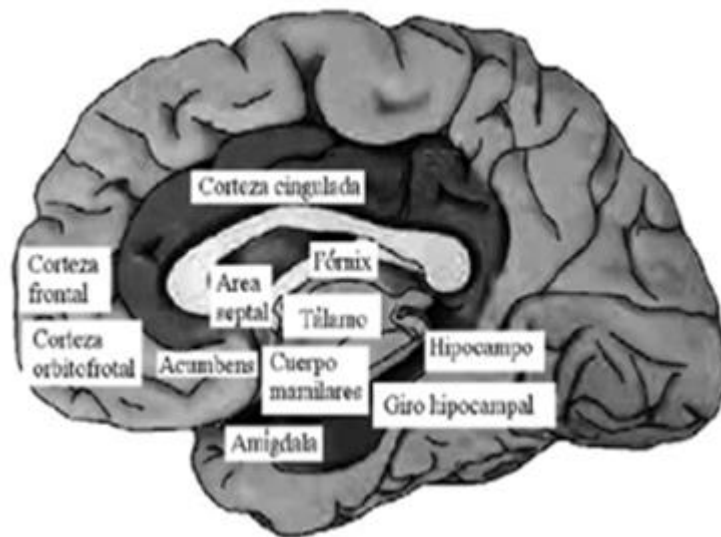


Fig. 1: Disposición anatómica del sistema límbico en el humano (López *et al.*, 2009).

En 1883, James Papez (1929) propuso que la estructura de origen cortical que se encarga de representar y determinar los sentimientos es el lóbulo límbico. Esta estructura fue identificada previamente por Paul Broca. El término de sistema límbico fue acuñado por Paul McLean, quien lo consideró así debido a que se incluían partes del hipotálamo, el área septal, el núcleo accumbens, las áreas neocorticales y la amígdala (Rodríguez & Contreras, 1998).

El lóbulo límbico es un anillo filogenéticamente proveniente de corteza primitiva que se encuentra sobre el tallo cerebral e incluye el giro cingulado, el giro parahipocampal y la formación hipocampal, que se localiza en la parte profunda del giro parahipocampal.

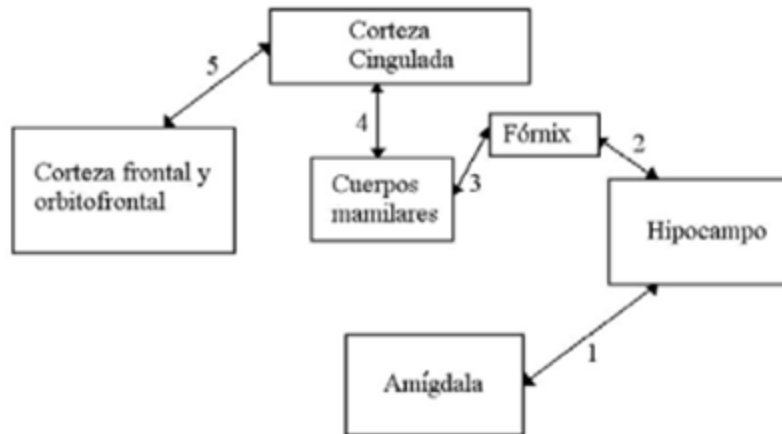


Fig. 2: Flujo de señales que se establece entre las estructuras del sistema límbico, lo que determina una cadena neural que presenta la base fisiológica del sistema que regula las emociones (López et al., 2009).

Su estructura morfológica es tan simple como una corteza enrollada. La formación hipocampal incluye al hipocampo, al giro dentado y al subículo.

Papez (1929) señala que la comunicación entre el hipocampo y la corteza cerebral (neocorteza) se lleva a cabo de manera recíproca. De esta forma, la neocorteza y el hipotálamo están en comunicación constante y una estructura influye en la otra por medio del giro cingulado. Así, la comunicación se llevaría en el siguiente orden: la formación hipocampal procesa la información que proviene del giro cingulado y la lleva hasta los cuerpos mamilares del hipotálamo vía fórnix (fibras que en parte sacan información del hipocampo). Al mismo tiempo, el hipotálamo envía información al giro cingulado por la vía cuerpos mamilares-núcleo talámico anterior (tracto mamilo-talámico) y de aquí a la corteza frontal de acuerdo a López *et al.* (2009) (Fig. 2).

Este sistema participa tanto en el procesamiento de los fenómenos agudos de recompensa que activan las drogas de abuso, como en las neuro adaptaciones asociadas a la administración crónica de dichas drogas y en los fenómenos de aprendizaje que conducen a la formación del hábito anómalo que caracteriza a los adictos (Rodríguez *et al.*, 1998). La amígdala y el hipocampo son dos de las estructuras más importantes del sistema límbico. La amígdala es el asiento de la memoria emocional así como el hipocampo lo es de la memoria declarativa. Existen fuertes conexiones anátomo-fisiológicas entre la amígdala, el hipocampo y el hipotálamo.

### **2.2.1Hipotálamo**

El *hipotálamo* es una estructura fundamental que prepara al organismo para actuar ante situaciones que impliquen un sobreesfuerzo ante demandas ambientales. Está íntimamente implicado en el eje neuroendocrino y endocrino de respuestas a medio y largo plazo ante situaciones estresante. También relacionada con la emoción, su estimulación provoca reacciones de ira y ataque acompañada de reacciones de tipo simpático como taquicardia, hipertensión, secreción de adrenalina etc., lo que sugirió que estaría implicado en el inicio de la respuesta de defensa (Sánchez& Román,2004).

#### **2.2.1.1Núcleos del hipotálamo**

**Cada núcleo está localizado de manera específica para llevar a cabo funciones determinadas** (Fig.3, 4, 5)(Bleier et al., 1979; Palkovits & Zeborsky, 1979)

El hipotálamo puede dividirse en:

Hipotálamo anterior:

Área preóptica medial y lateral

Área hipotalámica anterior

Núcleo supraóptico

Núcleo paraventricular

Núcleo supraquiasmático

Núcleo parvocelular periventricular

Hipotálamo medio:

Núcleo dorsomedial

Núcleo ventromedial

Núcleo infundibular o arcuato

Área hipotalámica lateral

Área hipotalámica dorsal

Hipotálamo posterior:

Cuerpos mamilares

Núcleo premamilar

Núcleo intercalado

Área hipotalámica posterior

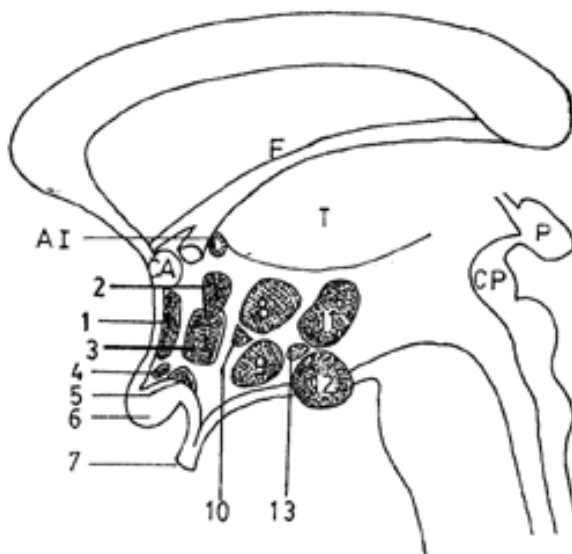


Fig. 3. Sección medial del hipotálamo: AI:Agujero interventricular, F: Fornix, T: Talamo, P: Pinel, CM: Comisura posterior, 1. Área preóptica, 2. Núcleo paraventricular, 3. Núcleo anterior, 4. Núcleo supraquiasmático, 5. Núcleo supraóptico, 6. Quiasma óptico, 7. Tallo pituitario, 8. Núcleo dorsomedial, 9. Núcleo ventromedial, 10. Núcleo perifornical, 11. Núcleo posterior, 12. Núcleo gémini.

### **2.2.2 Amígdala**

La *amígdala* es una estructura formada por 3 núcleos, dependiendo su posición, estos son: central, lateral, medial (Fig. 5), tiene forma de almendra que forma parte del sistema límbico. Se conecta con el hipotálamo, el núcleo septal, el área pre frontal y el núcleo medio dorsal del tálamo. Estas conexiones hacen que la amígdala cumpla una importante función en la mediación y control de las actividades afectivas más importantes como la amistad, amor y efecto, en la expresión de los estados de ánimo, miedo, ira y agresión. La amígdala, al ser el centro de la identificación de peligro, es fundamental para la supervivencia. En los seres humanos y otros animales está ligada a respuestas tanto de miedo como de placer. Diferentes condiciones, como la ansiedad, el autismo, la depresión, la narcolepsia, el trastorno por estrés posttraumático, las fobias y la esquizofrenia, están ligadas con un funcionamiento anormal de la amígdala debido a una lesión, trastornos del desarrollo o un desequilibrio de distintos neurotransmisores. Cuando llega al cerebro la información sensorial es procesada a nivel del tálamo y luego transmitida a los núcleos basales y baso- laterales de la amígdala. La amígdala es la instancia central del cerebro que, recibiendo múltiples aferencias (tálamo, corteza entorrinal, etc.) produce, a través de sus múltiples eferencias, las respuestas de ansiedad y miedo (Castro *et al.*, 2005). La lesión de la parte anterior y posterior de la amígdala central y la parte anterior de la amígdala baso lateral de la rata, reduce la ansiedad (Treit *et al.*, 1993).

Es la amígdala y no el hipotálamo la estructura implicada en el inicio de la respuesta de defensa, mientras que el hipotálamo constituye la estructura responsable de los cambios vegetativos que acompañan a la emoción, pero no de su inicio. Estas conexiones hacen que la amígdala cumpla una importante función en la mediación y control de las actividades afectivas más importantes como la amistad, amor y efecto, en la expresión de los estados de ánimo, miedo, ira y agresión. La amígdala, al ser el centro de la identificación de peligro, es

fundamental para la supervivencia. Está considerada como una estructura esencial para el procesamiento emocional de las señales sensoriales, ya que recibe proyecciones de todas las áreas de asociación sensorial. Además de las proyecciones corticales procedentes de las distintas áreas de asociación sensorial, la amígdala también recibe aferencias talámicas. Este conjunto de proyecciones, tanto talámicas como corticales, hacia la amígdala es lo que posibilita que se dote de un significado afectivo a las características estímulares (Sánchez & Román 2004).

La administración de agonistas GABAérgicos, disminuyen algunos síntomas de la ansiedad y de la depresión (Jonas & Cohon 1993). Sin embargo, otros neurotransmisores como la serotonina (5-HT), la noradrenalina (NA) y la dopamina (DA) también están involucrados en la fisiopatología de los trastornos por ansiedad (Rodríguez & Contreras, 1998).

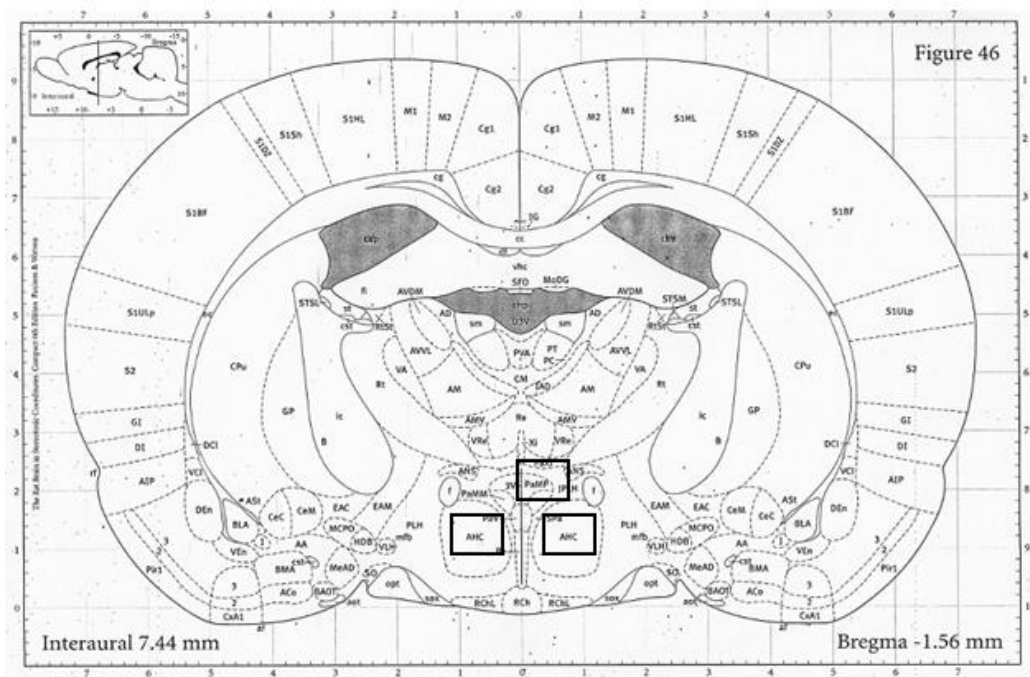


Fig.4: Estructura del Hipotálamo: AHC (área hipotalámica anterior), PaV (núcleo hipotalámico-paraventricular) (Paxinos & Watson 2009).

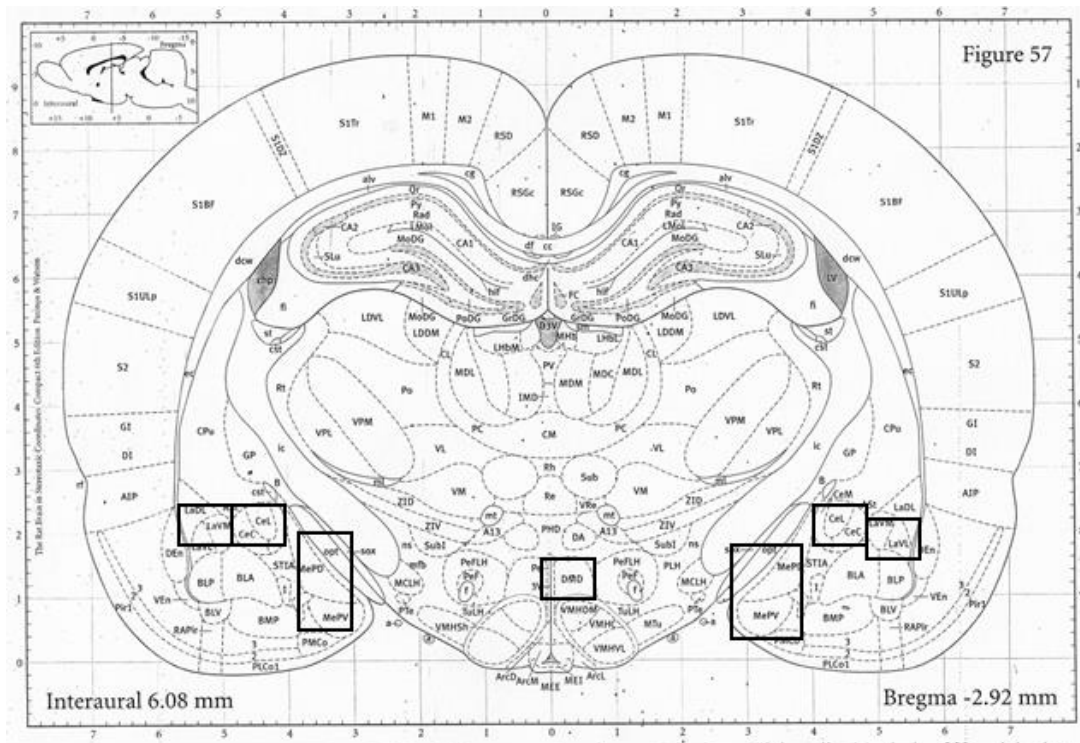


Fig. 5: Estructuras del hipotálamo: DMD (núcleo hipotalámico dorsomedial). Estructuras de la amígdala: LaVM, LaVL, LaDL (núcleos amigdalinos laterales, ventromedial, ventrolateral y dorsolateral) MePV, MePD (Núcleos amigdalinos mediales, posteroventral y posterodorsal) (Paxinos& Watson 2009).

### 2.2.3 Conexiones entre los núcleos de la amígdala e hipotálamo

La disposición anatómica de la amígdala en mamíferos, parece haber sido conservadas evolutivamente, con núcleos particulares que están conectados a estructuras cerebrales, como el hipotálamo entre otras (Price, 2003). El núcleo lateral (La) de la amígdala está recíprocamente conectado con el auditivo, somatosensorial y centros de asociación visuales de tipo sensoriales en las cortezas temporales e insulares (Price, 2003). La amígdala medial (Me) se conecta recíprocamente con el bulbo olfatorio accesorio y muchos núcleos hipotalámicos, como el dorso medial y paraventricular (Canteras *et al.*, 1995; Price, 2003). El núcleo central (Ce) envía proyecciones GABAérgicas al tronco cerebral y al hipotálamo que controlan la expresión de respuestas autonómicas, hormonales y conductuales a situaciones emotivas (Davis & Whalen, 2001). La conectividad funcional entre los núcleos de la amígdala asegura que la información sensorial asociada a situaciones emocionales, tales como la ansiedad, se canalice a las regiones efectoras para producir respuestas apropiadas necesarias para la supervivencia. Los estudios farmacológicos de receptores

recombinantes han demostrado que las subunidades individuales y sus subtipos confieren diferentes sensibilidades a moduladores GABA<sub>A</sub> receptor (Hevers & Lüddens, 1998). El hipotálamo desempeña un papel importante en la regulación de una serie de funciones autónomas, incluyendo la ingesta de alimentos, la temperatura corporal, la actividad cardiorrespiratoria, nocicepción / analgesia, los ritmos circadianos, y el sistema endocrino como en el sistema de defensa (Meister, 1993). El GABA suprime la actividad de las neuronas del hipotálamo y se ha sugerido para ser el neurotransmisor inhibitorio predominante en el (Decavel & van den Pol 1990). Los receptores GABA, se encuentran en todo el hipotálamo (Xia & Haddad 1992).

#### **2.2.4 Modelos de ansiedad en animales**

En psicología y neurociencias se han desarrollado varios modelos animales para tratar de explicar algunas psicopatologías. Los modelos de animales tienen varias ventajas: se tiene control sobre el ambiente en que están los sujetos y de la historia conductual, se pueden realizar una gran cantidad de manipulaciones experimentales que nos permitan evaluar la eficacia terapéutica de diferentes tratamientos, lo cual a su vez permite evaluar los modelos (Pellow *et al.*, 1985).

Los modelos de ansiedad en animales miden respuestas conductuales o fisiológicas ante estímulos estresantes o novedosos. Algunos ejemplos incluyen, entre otros, el laberinto elevado en cruz (Pellow, 1985), la conducta defensiva de enterramiento (Treit *et al.*, 1981) y el modelo de interacción social (File, 1992). En estos modelos mencionados, se evita la privación de agua y comida, así como la administración de choques eléctricos y no se requiere de periodos largos de entrenamiento. Por otro lado, su validez se ha visto reforzada por la efectividad que tiene la administración de drogas usualmente empleadas en el tratamiento de ansiedad en reducir la respuesta (Parmigiani *et al.*, 1999).

Existen ciertos problemas asociados al uso de los modelos que se basan en la actividad exploratoria. Se ha observado que dosis bajas de los ansiolíticos aumentan la actividad exploratoria, mientras las dosis altas las inhiben. La actividad motora puede cambiar ante situaciones novedosas y este efecto es dependiente del tiempo, observándose

inicialmente un incremento y posteriormente un decremento. Por otro lado, los efectos en sobre la actividad motora no son específicos para los ansiolíticos (Treit *et al.*, 1985). Parte de estos problemas se han solucionado con el uso de análisis adicionales de la conducta exploratoria, como en el caso del modelo de laberinto elevado en cruz. Este modelo se basa en el miedo incondicionado que tienen los roedores a los espacios abiertos. Es una prueba que tienen varias ventajas porque es económico, no requiere de entrenamiento, requiere de poco tiempo (usualmente 5 minutos), se basa en la actividad exploratoria y se miden diferentes parámetros como el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, así como el tiempo de permanencia, número total de entradas, que no son índices de diferentes componentes como ansiedad y actividad motora (File & Zangrossi 1993). Actualmente este procedimiento es el más empleado para evaluar ansiedad aunque no es lo suficientemente sensible a los efectos ansiolíticos no benzodiazepínicos (Rodgers & Cole 1994).

Este modelo se ha considerado como una herramienta para el estudio de la ansiedad generalizada. Cuando los sujetos son expuestos por segunda ocasión al laberinto elevado en cruz, el efecto ansiolítico de las benzodiazepinas no se manifiesta, a este fenómeno se le ha denominado “Tolerancia a un ensayo” y se ha propuesto que el tipo de respuesta medida al segundo día es diferente a la medida el primer día (Cruz-Morales, Santos & Brandão 2002). Se ha propuesto que en estas condiciones, el primer día se mide una respuesta incondicionada y el segundo día se mide una respuesta diferente, resultado del aprendizaje y equivalencia a la fobia (File & Zangrossi 1993).

### **2.3 Benzodiazepinas**

Las benzodiazepinas constituyen un grupo de fármacos emparentados químicamente, que tienen la capacidad de producir una depresión selectiva subcortical del SNC., afectando fundamentalmente al Hipotálamo y sistema límbico. Estos compuestos se caracterizan por poseer acciones farmacológicas similares; ya que todas ellas poseen efectos ansiolíticos, sedantes, anticonvulsivantes, producen amnesia, hipnosis y un cierto grado de relajación muscular, es por ello que son usados en medicina para la terapia de la ansiedad, insomnio y otros estados afectivos, así como las epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos

musculares. Son también usados en ciertos procedimientos invasivos como la endoscopia o dentales cuando el paciente presenta ansiedad, o para inducir sedación y anestesia (Rosas-Gutiérrez, Simón-Arceo, Mercado, 2013).

### **2.3.1 Historia**

La primera benzodiazepina fue el clordiazepóxido nombrado inicialmente metaminodiazepóxido, descubierta en 1949 por el científico Leo Sternbach (1908–2005) y sintetizada luego en 1955 por los laboratorios Roche en Nutley, Nueva Jersey y comercializada a partir de 1957 bajo el nombre de Librium derivado de las sílabas finales de equilibrium. Las pruebas realizadas con el clordiazepóxido en animales demostraron que el compuesto era un efectivo hipnótico, ansiolítico y relajante muscular. Después del lanzamiento del clordiazepóxido, se comercializó el diazepam con el nombre de valium, una versión simplificada del clordiazepóxido, seguido por otras benzodiazepinas (Cooper, Floyd, Roth, 2011).

En Estados Unidos en el año de 1977 se fabricaron 800 toneladas de benzodiazepinas en donde los efectos más notables ocurrían entre pacientes alcohólicos e incluso se reportaba que las úlceras y ciertos problemas dermatológicos que implicaban estados emocionales, se reducían con el clordiazepóxido (Cooper *et al.*, 2011).

### **2.3.2 Adicción a BZD**

La adicción a drogas es una enfermedad crónica, que se caracteriza por la pérdida del control sobre el uso de una sustancia, que pasa a ocupar un lugar preferencial en la vida del individuo (Rodríguez *et al.*, 2003). Después de algunas semanas o meses, se determina que un número de pacientes ya no puedan suspender su utilización, debido al desarrollo de dependencia física y tolerancia selectiva (Valsecia & Malgor, 2002).

El uso y prescripción de las BZD se ha relacionado con un alto riesgo de abuso y dependencia debido a su manejo inadecuado ya que, aun administradas regularmente a

niveles terapéuticos, poseen un potencial de dependencia mayor que otros fármacos de acción ansiolítica. Asimismo, se ha reportado tolerancia farmacológica cuando la prescripción es por un tiempo mayor a las cuatro semanas, así como la aparición de síndrome de abstinencia en el 30% de los pacientes después de un tratamiento de ocho semanas de duración (Rosas-Gutiérrez, 2013).

Las BZD son las drogas más prescritas en los desórdenes de ansiedad. El mecanismo de acción de las benzodiazepinas es por medio de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> potenciando la acción inhibitoria del ácido gamma amino-butírico (GABA, por sus siglas en inglés). Los receptores de las benzodiazepinas se distribuyen en el cerebro y la médula espinal; también se encuentran periféricamente. El uso crónico de las BZD produce tolerancia y dependencia, fenómenos relacionados en forma importante con la farmacodinamia de estos fármacos (File, 1992). Todas las BZD son bases orgánicas débiles, son muy liposolubles y se absorben rápido y completamente por vía oral (Valsecia & Malgor, 2002).

Las BZD son empleadas frecuentemente en anestesia por sus efectos ansiolíticos, anticonvulsivos, sedantes, amnésicos e hipnóticos. Se ha recomendado más el uso de M en lugar de otras benzodiazepinas ya que el inicio de su efecto es más rápido, su poder amnésico es mayor, la duración es más breve por su vida media corta y las secuelas venosas por su inyección por esta vía son mínimas (Ramírez & Burkle 1992).

La mayoría de los hipnóticos utilizados son BZD de acción rápida, pierden su efecto en pocas horas, para evitar cansancio o falta de lucidez en la mañana siguiente. Pero se deben discontinuar gradualmente para evitar el efecto rebote, ya que el riesgo es mayor con las BZD de acción corta que las de vida media larga (Valsecia & Malgor, 2002).

### **2.3.3 Farmacocinética**

Todas las BZD tienen el mismo mecanismo de acción y efectos adversos similares; sin embargo, difieren marcadamente en sus características farmacocinéticas. Son justamente estas diferencias las que les otorgan características particulares que definirán la elección de un fármaco sobre otro. Conocer entonces la farmacocinética de las benzodiazepinas tiene una indiscutible importancia clínica (Lader, 1987).

#### **2.3.3.1 Absorción**

La mayoría de las BZD (excepto el clorazepato) se absorben adecuadamente luego de su administración oral, especialmente cuando el estómago se encuentra vacío. Con el estómago lleno la absorción oral se retrasa, aunque la tasa de absorción total no disminuye (Morón, Borroto, Calvo, Cires, Cruz, Fernández, 2009). Los antiácidos pueden alterar la absorción de las BZD por lo que se recomienda que sean ingeridas lejos de la administración de los mismos. El pico plasmático luego de la administración oral se logra entre la media y la sexta hora post-ingesta, existiendo diferencias entre las drogas (Chaves, 1987; Morón *et al.*, 2009). La BZD que se absorba antes tendrá un pico plasmático mayor que aquella que tiene su pico plasmático más tardío (Lader, 1987). Existen presentaciones de BZD para administración sublingual (clonazepam, alprazolam, lorazepam). Su velocidad de absorción es apenas ligeramente superior a la oral, por lo que su utilidad queda reducida a aquellos pacientes que tienen dificultad para tragar o para aquellos que tienen el estómago ocupado por haber ingerido una comida recientemente, y requieren una rápida absorción del fármaco, dado que, como se explicó previamente, el estómago lleno retrasa la absorción de las BZD (Jenike, 1988). La absorción por vía intramuscular es dispar respecto de cada droga y del sitio de aplicación. En general se acepta que deben administrarse en músculos con buena irrigación, como el deltoides. Lorazepam y midazolam se absorben bien por esta vía (Bulach, Myles, Russnak, 2005. 2005; Jenike, 1988). El diazepam tiene absorción intramuscular errática. Por vía intravenosa las BZD son administradas con frecuencia para la sedación pre-anestésica y tratamientos de ansiedad (midazolam) (Bulach *et al.*, 2005). Debe recordarse que toda vez que se administren BZD por vía intravenosa la infusión debe ser lenta (1 a 2 minutos) para prevenir el riesgo de depresión respiratoria que existe con la infusión en bolo (Pérez, 2002).

### 2.3.3.2 Distribución

Una vez que la droga ingresó al organismo se distribuye por el plasma y otros tejidos bien perfundidos como el SNC donde alcanza concentraciones similares a las del plasma, buscando un equilibrio de concentración (Perez, 2002). En esta primera fase, denominada fase a, el mayor porcentaje de la disminución de la droga en plasma corresponde a su distribución constituyendo la metabolización un porcentaje mínimo. Transcurrido un determinado tiempo, la concentración en plasma disminuye al punto que equipara a la de los tejidos periféricos. Es entonces cuando la eliminación del compartimento central (plasma) depende fundamentalmente de los procesos de metabolización y excreción de la droga. A este segundo momento se lo denomina fase b. Es importante recalcar que cuando una BZD se administra en dosis única, la velocidad con la que esta ingrese a biofase (latencia de acción) y se elimine de este compartimento (duración de acción) depende fundamentalmente de la fase a. Por lo tanto, aquellas drogas que sean más liposolubles tendrán una latencia menor y a la vez una duración de acción también menor por pasar con más facilidad las barreras biológicas (Lader, 1987). Además, en esta circunstancia la vida media de la droga tiene poca importancia para predecir la duración de acción del fármaco porque esta variable no depende del metabolismo de la droga (Bulach *et al.*, 2005). Cuando la droga se administra en forma oral, otras son las variables que deberán tenerse en cuenta para predecir la velocidad de comienzo de acción de una BZD. Como ejemplo basta ver que el midazolam, droga altamente liposoluble, que luego de administrarse por vía intravenosa tiene una latencia de acción muy baja y una duración de acción posterior a la primera dosis, muy corta, razón por la que se la usa para la sedación pre anestésica (Lader, 1987). Sin embargo, administrada en forma oral tiene una latencia de acción mayor; aún mayor que la de otras BZD altamente liposolubles como el diazepam. Esto sucede porque el midazolam tiene una extracción de primer paso hepático mayor a la del diazepam (Bulach *et al.*, 2005). Un caso diferente se presenta cuando la droga se administra en dosis repetidas. En este caso, los sitios periféricos de unión de la droga se encontrarán ocupados y la depuración de la droga del plasma dependerá fundamentalmente de la vida media  $t_{1/2}$ , lo que es lo mismo, de su metabolismo y excreción. Por esto, cuando las BZD se administran en forma repetida, la duración de acción depende de la vida media de la droga (Jenike, 1988). Otra situación de importancia clínica se presenta cuando los pacientes son tratados en forma crónica con

BZD de alta potencia y vida media corta o intermedia como el alprazolam, midazolam o el triazolam (Chaves, 1987). Los pacientes pueden manifestar síntomas de rebote si los períodos interdosis son prolongados porque en este caso, la duración de acción depende de la vida media b del fármaco y la de sus metabolitos activos. Unión a proteínas: Las BZD se unen en alto porcentaje a las proteínas plasmáticas, aunque no se describen interacciones de importancia con otras drogas en relación a esta característica farmacocinética. Las diferencias existentes en el porcentaje de unión a proteínas entre cada una de las benzodiazepinas depende fundamentalmente de la liposolubilidad de cada compuesto. 6 Liposolubilidad: si bien existen diferencia entre ellas, todas las BZD son altamente liposolubles. Atraviesan la placenta y pasan a leche materna (Martindale, 1982).

#### **2.3.4 Farmacodinamia**

Las propiedades de las BZD como relajantes musculares, anticonvulsivas e inductoras del sueño, están claramente mediadas por la ocupación de receptores que son parte de un gran complejo macromolecular, contiene receptores GABA y canales de cloro (Mendelson, 1987).

Los receptores de BDZ se distribuyen por todo el cerebro, la médula espinal, glándulas adrenales, riñones, glándula pineal y plaquetas. La unión de la BDZ al receptor GABA requiere la presencia del aminoácido histidina. Las BZD también se unen a la membrana de las células gliales (Ashton, 2002). Cuando el GABA se une a los receptores GABA, contribuye a la apertura de los canales iónicos del Cl, lo que lleva a la hiperpolarización celular, y a que la célula disminuya la posibilidad de producir potenciales de acción (Breier,*et al.*, 1984).Las BDZ se ligan a un receptor específico en la membrana neuronal, que se encuentra relacionado con los receptores GABA e incrementa el flujo de Cl, de esta manera las BDZ incrementan la inhibición neuronal mediante un mecanismo GABA dependiente. El resultado final del tratamiento prolongado de BDZ es disminuir la inhibición neuronal mediada por GABA (Ashton, 2002). La mayoría de los agonistas GABA producen incremento de la secreción de prolactina en humanos, aunque el valproato

puede tener efecto opuesto en mujeres. Los agonistas GABA actúan directamente sobre receptores GABA en hipotálamo y pituitaria (Shur,*et al.*, 1983).

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de los mamíferos, donde aproximadamente el 30 % de las sinapsis son GABAérgicas (Rudolph, 2008). El GABA puede activar dos tipos de receptores, uno metabotrópico (GABA<sub>B</sub>), acoplado a una proteína G con función presináptica y postsináptica, y uno ionotrópico (GABA<sub>A</sub>) con función sináptica localizado en la membrana postsináptica (Lorenzo *et al.*, 2005; Rudolph, 2008). El receptor GABA<sub>A</sub> es el receptor inhibitorio acoplado a un canal iónico más abundante en el SNC, su poro conductor es selectivo para iones Cl y es modulado alostéricamente por diferentes fármacos como las BZD, los barbitúricos y también por el etanol. Este receptor es una glicoproteína heteropentamérica formada por la combinación de múltiples subunidades polipeptídicas (Lorenzo *et al.*, 2005).

Se conocen siete clases de subunidades formadoras de poro ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  y  $\rho$ ) y diversas isoformas para cada clase. A la fecha se han identificado 18 subunidades. Sin embargo, la estequiometría más frecuente de los receptores es cuando se encuentran formados por dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una  $\gamma$  (Lorenzo *et al.*, 2005).

El sitio de unión específico a las BZD en el receptor GABA<sub>A</sub> es llamado *sitio de unión benzodiazepínico* (Lorenzo *et al.*, 2005). La sustitución de este aminoácido por algún otro en esta posición evita el efecto farmacológico de las BZD. Los ligandos de estos sitios no están limitados a los fármacos de estructuras benzodiazepínicas. El mecanismo de activación del receptor GABA<sub>A</sub>, tanto por benzodiazepinas como por no benzodiazepinas, aparentemente es el mismo (Lorenzo *et al.*, 2005; Rudolph, 2008).

El acoplamiento de las BZD a su sitio de unión en el receptor GABA<sub>A</sub> genera un incremento en la frecuencia de apertura del canal iónico con respecto, cuando el receptor GABA<sub>A</sub> se encuentra sólo en presencia del neurotransmisor GABA (Fig. 6, 7). En otras palabras, las BZD potencian el efecto del neurotransmisor GABA sobre sus receptores

ionotrópicos, lo que permite una mayor entrada del ion cloro a las neuronas favoreciendo la hiperpolarización de su potencial de membrana; la neurona se vuelve menos susceptible a los estímulos activadores (menos excitable) y se produce un estado de inhibición neuronal (Fig. 8) (Lorenzo *et al.*, 2005).

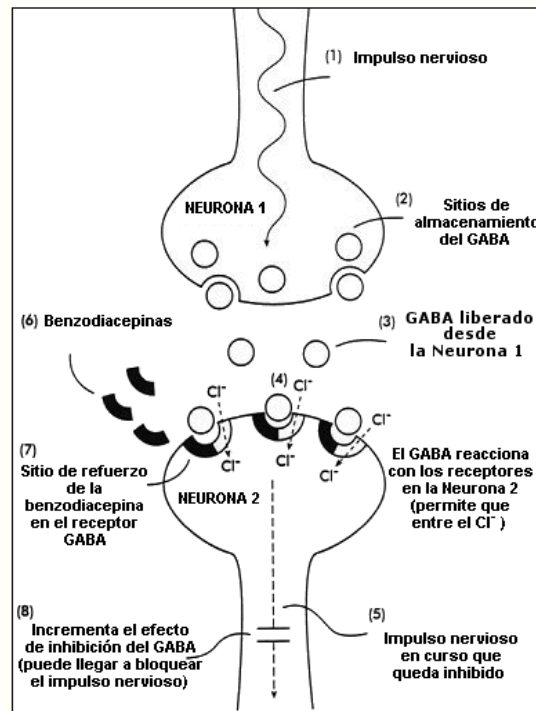


Fig. 6: Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor natural GABA (ácido gamma-aminobutírico) y de las BZD en las células del sistema nervioso (neuronas) en el cerebro (Ashton, 2002).

En el contexto de la ansiedad, se ha demostrado que las BZD y otras drogas ansiolíticas ejercen sus acciones por la estimulación de los receptores  $\text{GABA}_A$ . Estos receptores se encuentran localizados sobre la membrana neuronal y contienen un sitio de alta afinidad para las benzodiacepinas (Olsen & Tobin, 1990). El receptor  $\text{GABA}_A$  es un pentámero integral de un complejo de glicoproteínas (Richards *et al.*, 1992). Los receptores  $\text{GABA}_B$  y  $\text{GABA}_C$  no tienen relación con los receptores benzodiacepínicos. Es necesario destacar la importancia de estos receptores  $\text{GABA}_A$ , debido a que gran cantidad de neurofármacos ansiolíticos actúan sobre ellos, teniendo su clara indicación en algunos tipos de los trastornos de ansiedad (Fors *et al.*, 1995).

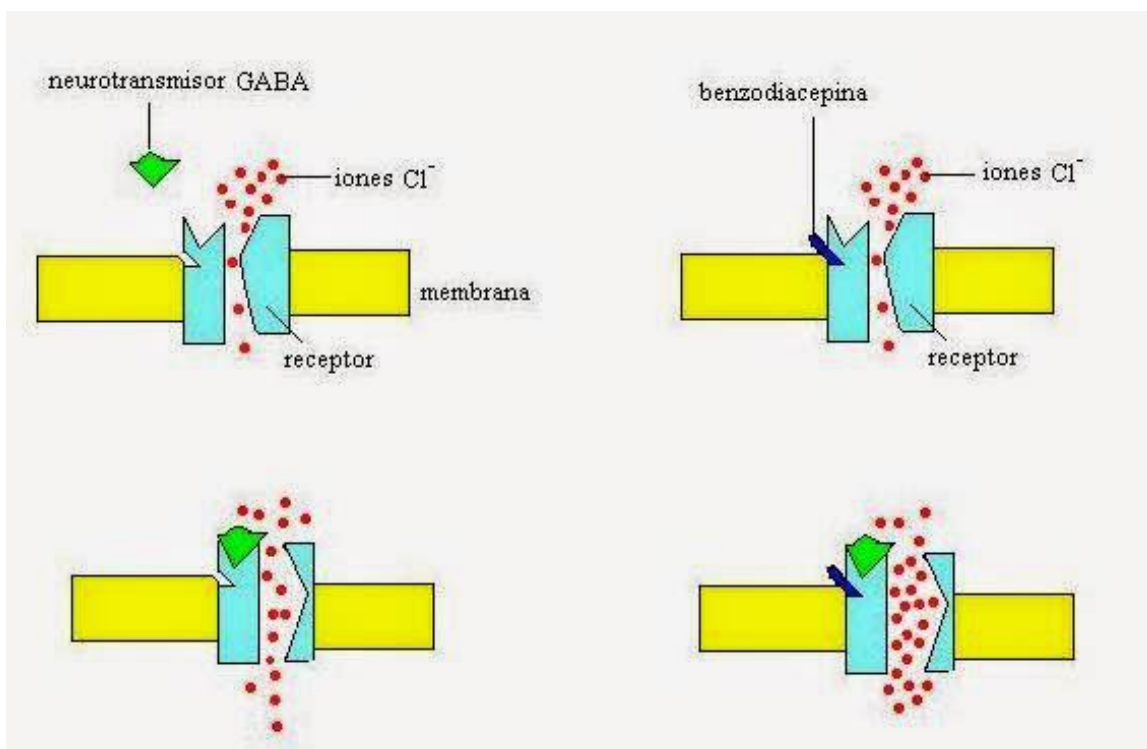


Fig. 7: El neurotransmisor GABA y las BZD se encuentran unidos a sus respectivos sitios en el receptor, la apertura de canal es mayor y consecuentemente la entrada de CL en la neurona es mayor

El complejo de receptores GABA<sub>A</sub> está constituido por varias subunidades que forman un canal iónico y contiene el sitio de conocimiento para el GABA y otras sustancias agonistas como las BZD y los barbitúricos. Cuando los sitios de reconocimiento de los receptores son ocupados por los agonistas, se incrementa la actividad GABAérgica. Por el contrario, cuando son ocupados por antagonistas la actividad GABAérgica disminuye. Por ejemplo, cuando las benzodiazepinas se acoplan a los receptores GABA<sub>A</sub> post sinápticos, conducen a un incremento de la frecuencia de apertura del canal iónico, con un consecuente aumento del flujo de iones Cl<sup>-</sup> hacia el interior de las de la neurona. Esto provoca una hiperpolarización neuronal que produce un efecto inhibitorio (Fig. 7) (Stephenson *et al.*, 1991).

Por el contrario, los antagonistas bloquean la apertura de los canales iónicos, con la consecuente desinhibición neuronal, cuyo efecto produce una excitación que puede provocar convulsiones (Fig. 8).

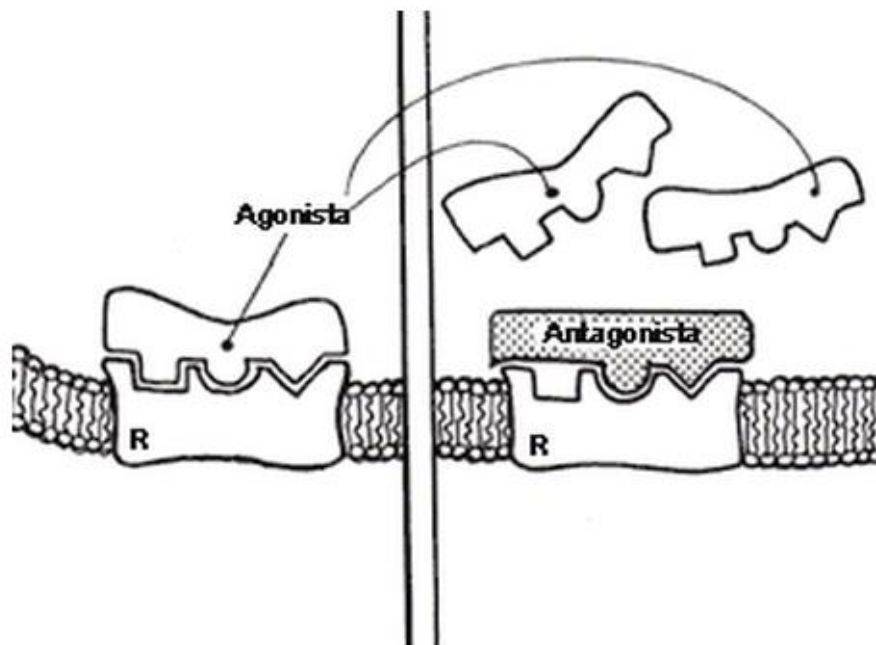


Fig. 8: El receptor (R) localizado en la membrana celular es capaz de reconocer fármacos con una configuración adecuada, en este caso, un cuadrado, un semicírculo y un triángulo. Ambos son capaces de ocupar el sitio receptor, es decir, tienen afinidad por sólo un sitio que contiene las tres formas geométricas, capaz de producir un efecto farmacológico, eficaz. El antagonista, al ocupar el sitio, impide que moléculas agonistas actúen en el receptor (Brailowsky, 2008).

### **2.3.5 Tolerancia a BZD**

La tolerancia a muchos de los efectos de las BZD aparece cuando el consumo es habitual: la dosis inicial de la droga tiene cada vez menos efecto y se necesita una dosis cada vez más elevada para lograr obtener el efecto inicial. La tolerancia a los efectos ansiolíticos se desarrolla lentamente, pero tenemos poca evidencia que demuestre que las BZD mantengan su eficacia después de algunos meses de uso (Ashton, 1995). De hecho, pueden incluso agravar estados de ansiedad si se consumen a largo plazo. Muchos pacientes descubren que los síntomas de ansiedad aumentan poco a poco durante los años venideros a pesar de que sigan consumiendo BZD continuamente, e incluso pueden aparecer por primera vez ataques de pánico y agorafobia después de años de consumo crónico. Este empeoramiento de los síntomas durante el uso a largo plazo de las benzodiazepinas probablemente se debe al hecho que se desarrolla tolerancia a los efectos ansiolíticos, y de esta forma pueden surgir síntomas de abstinencia, aun cuando la droga sigue estando presente en el organismo (Ashton, 2002). No obstante, la tolerancia puede no llegar a ser total y los consumidores crónicos del fármaco a veces dicen que éste sigue siendo eficaz, lo cual en parte se puede deber a que la droga suprime los síntomas de abstinencia que aparecerían si se suspendiera la ingestión. A pesar de todo, en la mayoría de los casos estos síntomas desaparecen gradualmente después de la reducción del consumo de benzodiazepinas y de la posterior suspensión (Ashton, 1994).

La tolerancia a los efectos anticonvulsivos hace que, por lo general, las benzodiazepinas no sean adecuadas para el tratamiento a largo plazo de la epilepsia. La tolerancia a los efectos motores de las benzodiazepinas puede producirse con una intensidad digna de consideración, y hasta puede suceder que las personas que consumen dosis elevadas no tengan dificultad alguna en andar en bicicleta y en participar en juegos de pelota. Sin embargo, no parece que se produzca tolerancia total a los efectos que estos fármacos tienen en las funciones mnemónicas y cognitivas. Muchos estudios demuestran que dichas funciones quedan afectadas en las personas que usan las benzodiazepinas en forma crónica, y que éstas se recuperan lentamente, aunque a veces de forma incompleta, después de la suspensión de la droga (Ashton, 1994).

La tolerancia es un fenómeno que se produce cuando se consumen drogas en forma crónica (incluso el alcohol, la heroína y la morfina y el hachís o marihuana). El organismo responde a la presencia continuada de la droga con una serie de mecanismos de adaptación que tienden a superar los efectos de la misma. En el caso de las BZD, los cambios que se producen para compensar su presencia tienen lugar en el GABA y en los receptores benzodiazepínicos, los cuales se hacen menos reactivos, de modo que disminuye la acción inhibitoria del GABA y la de las benzodiazepinas. La tolerancia a los distintos efectos de las BZD puede variar de un individuo a otro, probablemente como resultado de las diferencias en la estructura neurológica y química intrínseca de cada persona, que se reflejan en las características de la personalidad y en la susceptibilidad individual al estrés. El desarrollo de la tolerancia es uno de los motivos por los cuales la gente se hace adicta y además prepara el terreno para una mejor comprensión del síndrome de abstinencia (Ashton, 2002).

### **2.3.6 Tipos de tolerancia**

Existen diferentes tipos de tolerancia: farmacológica, asociativa.

*La tolerancia farmacológica* es la disminución de los efectos a un fármaco por su aplicación repetida, por lo que es necesario aumentar la dosis para obtener los efectos iniciales del fármaco. Algunos efectos desarrollan tolerancia rápidamente, en otros la tolerancia es de lento desarrollo, mientras que otras drogas no desarrollan tolerancia. En los casos en que se desarrolla tolerancia, ésta tiende a desaparecer con el tiempo después que suspende el uso del fármaco (Larson & Siegel 1998; Ramsay & Woods 1997).

La *tolerancia asociativa* o no farmacológica aparece cuando una droga es administrada siempre en el mismo contexto o se asocia siempre con las mismas señales o estímulos, de tal forma que si son evaluadas en un contexto diferente no se presenta la tolerancia (Siegel & Ramos 2002).

En humanos, los estímulos asociados al consumo de una droga también provocan sensación de abstinencia y ansiedad por consumir la droga; e incluso después de haber

pasado el síndrome de abstinencia a la droga se presentan recaídas. Aparentemente, muchas de las recaídas son provocadas por el contacto del organismo con los estímulos asociados al consumo (Siegel & Ramos, 2002). A este tipo de tolerancia se le llama tolerancia asociativa o dependiente del contexto y se detecta cuando la droga es administrada por la misma vía de administración, en presencia de las mismas señales asociadas a la administración y en el mismo contexto en que se hace la prueba de tolerancia (Siegel, 1989).

De acuerdo a los planteamientos asociativos, parece que los estímulos condicionados a las drogas tienen un papel relevante en los fenómenos de tolerancia, abstinencia y en las recaídas. Por ello se sugiere que el debilitamiento de la asociación entre la droga y los estímulos relacionados con su consumo tiene un papel importante en el tratamiento de las adicciones. A pesar de las evidencias publicadas sobre los mecanismos asociativos en el desarrollo de tolerancia a diferentes drogas, existe poca evidencia sobre los mecanismos de condicionamiento en el desarrollo de la tolerancia a las BZD (File, 1982; Greeley & Cappell, 1985; King, Bouton & Musty, 1987).

## 2.4 Midazolam y Flumazenil

El M tiene una vida media que oscila dentro de un rango que va de 1 a 4 horas siendo su principal metabolito el 1-hidroximetil M, por medio de la oxidación en los cromosomas hepáticos donde el grupo M es oxidado mucho más rápido que el anillo benzodiazepínico de las otras benzodiazepinas (Rosas-Gutiérrez *et al.*, 2013).

La genética del individuo es un elemento que también tiene influencia sobre su abuso (Wilson *et al.*, 2003). El M es una BZD que se metaboliza exclusivamente a través de la familia de las enzimas y a pesar de no ser polimórfica, su actividad varía de forma considerable entre los individuos (Gervasini *et al.*, 2004).

Los efectos de la sobredosis con M (y otras BZD) pueden ser controlados con F el cual es una imidazobenzodiazepina que bloquea los efectos centrales de las benzodiazepinas por interacción competitiva a nivel del receptor. Por lo tanto es un antagonista de las benzodiazepinas indicado para revertir los efectos centrales (la sedación, debilitación de la memoria, disminución de actividad psicomotora y depresión ventilatoria) de estos medicamentos (Katzung, 1995). El F, es un antagonista que bloquea los receptores BZD1 y BZD2. No produce cambios conformacionales, ocupa el receptor e impide la interacción del mismo con las BZD, de esta manera el receptor GABA opera exclusivamente por la acción de dicho neurotransmisor. La utilización del F se orienta en el tratamiento de intoxicaciones por BZD y por agentes depresores del SNC. También en la recuperación de la anestesia general con previo uso de BZD en la inducción (Valsecia & Malgor, 2002). El F actúa por inhibición competitiva de la unión de estos fármacos para el complejo receptor de GABA-benzodiazepina (Valsecia & Malgor, 2002).

## **2.5 Factores de transcripción de la familia AP-1**

### **2.5.1 Generalidades**

Los factores de transcripción son un conjunto de proteínas implicadas en la regulación y coordinación de la transcripción génica. En eucariotas, la transcripción es un proceso complejo que requiere la acción concertada de numerosas proteínas, incluyendo factores de transcripción y proteínas asociadas. Estos complejos multiproteicos son activados por señales externas y/o internas, transmitiendo esta señal por interacción con regiones específicas del ADN denominadas elementos en cis. Estos elementos se localizan en las regiones reguladoras de los genes, y la unión de factores de transcripción a los mismos modula la expresión génica (Herdegen & Leah, 1998; Lee *et al.*, 1987). Los mecanismos moleculares que dictan el ensamblaje ordenado de estos complejos multiproteicos y su regulación son todavía una incógnita.

Las proteínas AP-1 se unen a secuencias de ADN de doble cadena, siendo capaces tanto de activar como de reprimir la transcripción génica. Para este cometido, este grupo de proteínas tienen como requisito formar dímeros, tanto homo- como heterodímeros entre componentes de la familia AP-1 y proteínas de otras familias. Esta capacidad de formar heterodímeros entre proteínas con diferente especificidad de unión a ADN, incrementa enormemente el abanico de secuencias de ADN. La dimerización también permite el establecimiento de complejos reguladores más grandes, que pueden interaccionar con otras proteínas requeridas para la transcripción (Martin *et al.*, 1996).

#### **Miembros de la familia AP-1**

La familia AP-1 se divide en dos subfamilias denominadas Fos y Jun (Milde-Langosch, 2005). Los criterios de clasificación actuales se basan en las diferentes propiedades de unión a ADN: 1) Familia Fos: incluye las proteínas c-Fos, FosB. Las proteínas Fos se pueden unir al ADN formando heterodímeros con proteínas de la subfamilia Jun y con proteínas de otras subfamilias AP-1. 2) Familia Jun: incluye las proteínas c-Jun, JunB, JunD y la variante viral oncogénica v-Jun (Martin *et al.*, 1996).

### 2.5.2 c-Fos

Los genes se expresan en proteínas (o polipéptidos). Esta expresión se realiza mediante la formación primero de un ARNm a partir de un fragmento de ADN (*transcripción*) y la posterior traducción de esa molécula a proteína las cuales controlan la expresión de los genes, que pueden controlar, a su vez, la expresión de otros.

Hay un gen denominado *c-fos* que es un proto oncogén celular (gen cuyo producto regula positivamente el ciclo celular promoviendo el crecimiento y la división celular) (QiMei *et al.*, 2001), que se expresa en una proteína llamada *Fos*, la cual realiza el control de la transcripción: activa la transcripción de muchos de los genes implicados en los procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular con el fin de evitar procesos de invasión y daño celular. Generalmente, la expresión de *c-fos* en las células es muy baja y se activa por un estímulo determinado (Curran *et al.* 1984)

La expresión de c-Fos ha sido muy usada como indicador molecular de la actividad neuronal. Así, un incremento de la cantidad de la proteína fos de una neurona se explica como resultado de un aumento de los estímulos que recibe esa célula nerviosa. Por eso, en neurofisiología, uno de los métodos que se utilizan para identificar las zonas cerebrales que están en funcionamiento es detectar la presencia de la proteína Fos (Curran *et al.*, 1984; Sambucetti & Curran, 1986; Setoyama *et al.*, 1986).

### 2.5.3 Marcador de actividad neuronal

La proteína c-Fos pertenece a la familia de genes de expresión temprana, (IEGs) por sus siglas en inglés (Immediate early genes), los cuales codifican factores de transcripción en el sistema nervioso central por una gran variedad de estímulos (Tamminga, 1997) que aparecen inmediatamente luego de la estimulación, pero sólo por un breve lapso de tiempo. Ello se debe, no sólo a tiempos cortos de transcripción activa, sino también a la corta vida media de sus transcriptos (de no más de 40 minutos en el caso de *c-fos* (Shyu, 1989).

Los IEGs se activan en respuesta a cascadas de señalización intracelular (múltiples estímulos fisiopatológicos), activándose de forma rápida y transitoria (Herdegen & Leah, 1998; Sng *et al.*, 2004). Generalmente, la cinética de respuesta de Fos a un estímulo agudo es transitoria, con un pico del ARNm de *c-fos* aproximadamente a los 30 min y de la proteína c-Fos entre 90-120 min. Los niveles proteicos decrecen rápidamente, ya que la proteína es altamente inestable y se degrada por proteasoma (Kovács, 2008). La expresión de *c-fos* no está regulada por el ciclo celular, sino que se expresa constitutivamente, con unos niveles apenas detectables a lo largo del ciclo celular. Puede ser inducido por factores de crecimiento en cualquier fase del ciclo, exceptuando la mitosis (Bravo *et al.*, 1986).

La expresión del gen de c-Fos es inducida de manera rápida y transitoria en células de mamífero ante una gran cantidad de estímulos y de esta manera es como se ha usado como marcador neuronal (Sassone-Corsi, *et al.*, 1988). C-Fos, tiene varias ventajas metodológicas y experimentales, ya que es expresado a bajos niveles en el cerebro intacto bajo condiciones basales, además es inducido fácilmente por varias señales extracelulares o estímulos (Kovács, 2008), además dicha proteína puede ser usado como marcador de activación por neuronas individuales, debido a que esta proteína se encuentra en el núcleo de la célula, su identificación en las neuronas activadas puede hacerse mediante inmunohistoquímica (Hoffman *et al.*, 1993).

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

La ansiedad es una respuesta emocional o conjunto de respuestas que incluye: aspectos subjetivos o cognitivos de carácter poco placentero, aspectos corporales o fisiológicos caracterizados por un alto grado de activación del sistema periférico, aspectos observables o motores que suelen implicar comportamientos poco ajustados y escasamente adaptativos (Zoch, 1996). La ansiedad tiene una función muy importante relacionada con la supervivencia (Ashton, 2002). Para preservar su integridad física ante amenazas el ser humano ha tenido que poner en marcha respuestas eficaces y adaptativas durante millones de años. Los trastornos por ansiedad afectan del 5 al 10% de la población general y tienden a incrementarse debido a los factores estresantes ambientales y a los problemas socioeconómicos (Francesc, 1996). Los tratamientos farmacológicos utilizados en el control de la ansiedad son efectivos y del estudio de sus acciones es posible obtener indicadores relativos de las alteraciones que originan el proceso ansioso (King, 1987). En forma cotidiana experimentamos una serie de emociones como la ira, la alegría, la tristeza y la ansiedad (Castro, 2005). Esta última está presente en nuestras vivencias diarias y desempeña un papel importante en la adaptación y defensa ante situaciones de tensión o amenaza (Rodríguez & Contreras, 1998). En los trastornos por ansiedad participan algunas de las estructuras cerebrales que conforman el sistema límbico, y es ahí en donde se ha observado que los fármacos ansiolíticos ejercen algunas de sus acciones. El sistema límbico es el responsable de las emociones y de las estrategias asociadas a la sobrevivencia (McCann *et al.*, 1995). Experimentalmente se ha demostrado la participación de algunas de las estructuras límbicas en los procesos ansiosos. La aplicación de benzodiazepinas en la amígdala, producen acciones ansiolíticas. Estas acciones reductoras de ansiedad son antagonizadas por el flumazenil, un antagonista del complejo receptor GABA/benzodiazepinas. Las benzodiazepinas al igual que el alcohol y los barbitúricos, son depresores del SNC y al parecer ejercen una acción selectiva a nivel de algunas estructuras límbicas como la amígdala y el hipotálamo (McCann *et al.*, 1995). Pero, quizá los efectos indeseables más serios de estos fármacos surgen de su potencial adictivo: el uso repetido de

estas sustancias produce tolerancia y dependencia física y psicológica, por lo que existen serios problemas para suspender el tratamiento prolongado. Por otro lado, la interrupción brusca de los tratamientos con estos fármacos se acompaña de un síndrome de abstinencia, en el que pueden aparecer convulsiones tónico-clónico generalizadas, hipotermia y coma (López *et al.*, 2009). Este estudio ayudará a comparar la expresión de c-fos por tratamiento crónico y abstinencia de M y de la administración de flumazenil en diferentes contextos en amígdala e hipotálamo y además aportará información sobre los mecanismos neurales de la tolerancia farmacológica y asociativa.

---

## **4. HIPÓTESIS**

El uso repetido de las BZD se debe primordialmente a cambios farmacodinámicos en el sistema límbico, áreas en que se encuentran distribuidos los receptores a benzodiazepinas (receptores GABA<sub>A</sub>); dado que la tolerancia se desarrolla diferencialmente dependiendo del contexto, se espera que en las estructuras cerebrales como la amígdala e hipotálamo la expresión de c-fos sea diferente dependiendo del contexto.

---

## 5.OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de c-fos en el hipotálamo y la amígdala en la tolerancia y abstinencia, durante la administración de midazolam (M) o flumazenil (F) en diferentes contextos.

Dado que el desarrollo de la tolerancia varía en función de la vida media del fármaco, en este estudio se estudiarán los efectos de la administración de M que tiene una vida media muy corta. Se evaluarán los efectos por la administración aguda y crónica (para estudiar tolerancia y abstinencia) y de la administración de flumazenil (antagonista de las BZD) en sujetos expuestos a LEC.

### 5.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la administración aguda de Midazolam (M), en ratas sometidas a la prueba de LEC, así como la expresión de c-Fos en hipotálamo y amígdala involucradas en la ansiedad.
2. Evaluar el efecto de la administración crónica de midazolam (M), en ratas sometidas a una prueba de LEC, así como la expresión de c-Fos en hipotálamo y amígdala involucradas en la ansiedad.
3. Evaluar la presencia del síndrome de abstinencia después de la administración crónica de midazolam (M), en ratas sometidas a una prueba de LEC, así como la expresión de c-Fos en hipotálamo y amígdala involucradas en la ansiedad.
4. Evaluar el efecto de la administración crónica de M, después de la administración de flumazenil (F), en ratas sometidas a una prueba de LEC, así como la expresión de c-Fos en Hipotálamo y amígdala involucradas en la ansiedad.

## **5.2 Estrategia experimental**

Evaluar la expresión de c-Fos en el desarrollo de tolerancia farmacológica y asociativa a efectos ansiolíticos en diferentes contextos con MZ y FL, lo que permitirá diferenciar entre la tolerancia farmacológica (diferente contexto) y la asociativa (mismo contexto). Después de las prueba del laberinto elevado en cruz (ELC) se sacrificará a los sujetos, se les per fundirá y se obtendrá el cerebro, para posteriormente hacer los cortes y seguir el procedimiento de la técnica de c-Fos.

---

## 6.MATERIALES

**Sujetos:** Se emplearon ratas macho Wistar, experimentalmente ingenuas, de 250-270gr, peso al inicio del experimento, 160-180g para los grupos crónicos, provenientes del Bioterio general de la FES Iztacala-UNAM. Los sujetos (Ss) se alojaron en cajas de acrílico transparente (4 sujetos por caja), bajo un ciclo de luz/obscuridad 12:12, con libre acceso a agua y comida. Los sujetos (Ss) se asignaron aleatoriamente a grupos de 4 ratas cada uno.

**Aparatos:**

**Laberinto elevado en cruz (LEC):** El LEC está construido de PVC con dos brazos abiertos (50 x 10cm), y dos brazos cerrados de la misma medida, elevado a 50cm del piso, el nivel de iluminación fue de 50 lux. El diseño del laberinto se conforma de tal forma que los mismos tipos de brazos son opuestos a los otros (Fig. 9).

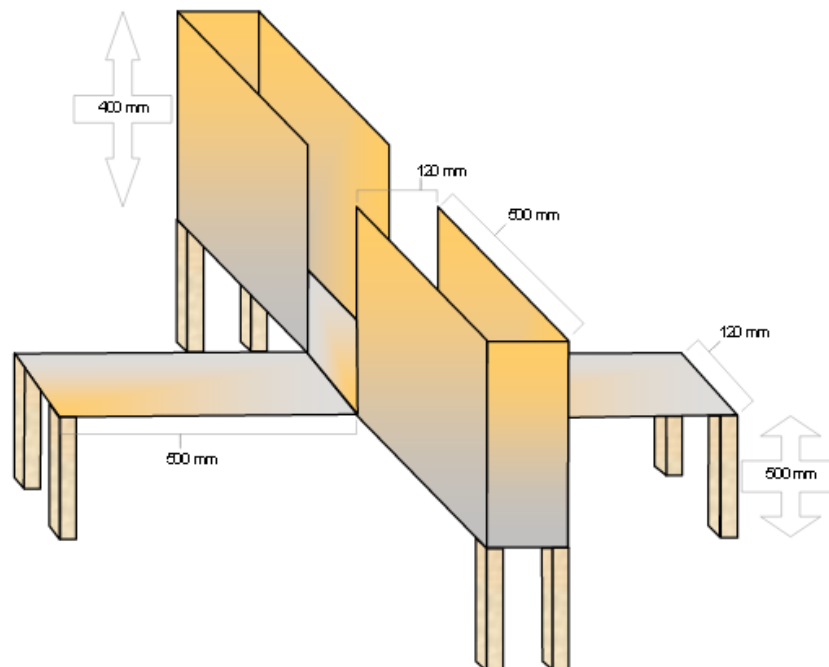


Fig. 9: Diseño esquemático del Laberinto en Cruz Elevado (LCE) con sus respectivas dimensiones.

Cámara de vídeo grabación: Cámara (CCD, Modelo CA-156SEIA) localizada 1 m arriba del cuadro central del laberinto, que permita una visión de los 4 brazos del laberinto. Los registros se grabaron (Videograbadora WJ-2096) y analizados posteriormente con el Software Observer (Universidad de Sao Paulo, Brasil).

Droga: Midazolam (Roche) y Flumazenil (Sigma).

---

## 7.METODOS

Primera parte:

Se evaluaron los cambios en la expresión de c-Fos ante la administración aguda de MZ, solución salina y exposición al LEC. Los sujetos a los que se les administraron solución salina (Ss) se asignaron al azar a 4 grupos (n=4), que recibieron una administración aguda de midazolam (1 mg/kg) inyectado intraperitonealmente (ip) (uno en contexto laboratorio y otro en bioterio), o solución salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg) ip en el contexto laboratorio (L), y un grupo control (C) que no recibió tratamiento farmacológico. Posteriormente los grupos fueron evaluados por 5 min en el LEC. Al finalizar la prueba en el laberinto cada sujeto se regresó al bioterio. Las administraciones se realizaron 15 min en el caso del MZ y 30 min antes en el caso de flumazenil. Dos horas después los Ss fueron sacrificados, perfundidos, para seguir con el procedimiento de c-Fos.

Segunda parte:

Para evaluar los cambios de c-Fos en la tolerancia asociativa y farmacológica se siguió el siguiente procedimiento:

- Tolerancia al M. Los Ss se asignaron aleatoriamente a 3 grupos (n=4). Adicionalmente dos grupos fueron inyectados con 1 mg/kg, ip de midazolam por 20 días (1 por día), uno en el contexto laboratorio (ML) y otro en el contexto bioterio (MB). El tercer grupo fue inyectado con salina (S) en un volumen equivalente (1 ml/kg) en el laboratorio; 30 min después de las administraciones se les regreso a su caja de alojamiento.

- Prueba de tolerancia. El día 21 a los grupos ML y MB se les administró M (1.0 mg/kg, ip), el tercer grupo se le administró solución salina en un volumen equivalente en el mismo contexto, siguiendo el mismo procedimiento. Se realizó la prueba en el LEC por 5 min, se grabó la sesión y se analizó los datos conductuales posteriormente. Dos horas después se realizó la perfusión, la extracción del cerebro y procedió el protocolo de c-Fos.

- Prueba de abstinencia. Los grupos ML y MB recibieron durante 20 días la administración de M (1.0 mg/kg, ip) el día 21 no se les administró la última dosis, el tercer grupo se le administró solución salina en un volumen equivalente en el mismo contexto, siguiendo el mismo procedimiento. Se realizó la prueba en el LEC por 5 min, se grabó la

sesión y se analizó los datos conductuales posteriormente. Dos horas después se realizó la perfusión, la extracción del cerebro y procedió el protocolo de c-Fos.

- Tolerancia a M con F. Los grupos ML y MB recibieron durante 20 días la administración de M (1.0 mg/kg, ip) el día 21 se les administró la última dosis de M con F, el tercer grupo se les administró solución salina en un volumen equivalente en el mismo contexto, siguiendo el mismo procedimiento. Se realizó la prueba en el LEC por 5 min, se grabó la sesión y se analizó los datos conductuales posteriormente. Dos horas después se realizó la perfusión, la extracción del cerebro y procedió el protocolo de c-Fos.

LEC: Se grabó la prueba para posteriormente analizar los siguientes parámetros conductuales: frecuencia del número de entradas a los brazos abiertos y cerrados, el tiempo de permanencia en éstos y en el cuadro central para cada uno de los sujetos. El criterio en ambos casos es que los sujetos tengan las 4 patas en el brazo; la duración de la sesión es de cinco minutos. Estos datos se usaron para calcular el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (EBA) de acuerdo a la siguiente fórmula:  $[(\text{No. Entradas a brazos abiertos} / (\text{No. abiertos} + \text{cerrados})) \times 100]$  y el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos (TBA):  $[(\text{tiempo en brazo abierto} / 300) \times 100]$ , así como el total de entradas (entradas en brazos abierto+entradas en brazos cerrados). El número total de entradas refleja el índice de la actividad motora, en estudios previos se demostró que este índice no varía por los efectos de las drogas y lo que coincide con los resultados obtenidos en la prueba de actividad motora, donde se registró por 30 min la actividad motora vertical y horizontal.

Contexto: El contexto se define como el espacio físico que conforma el Bioterio o Laboratorio donde los estímulos condicionados discreto/continuo (eje. un ruido, o un sonido y/o los estímulos que integran estos espacios físicos). En este estudio el cambio de contexto será el lugar físico, Laboratorio o Bioterio.

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

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

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

Manejo de los tejidos: Se diseccionó el encéfalo y se colocó en solución fijadora por 12 horas, posteriormente el tejido fue sometido al proceso de crio-protección que consiste en colocarlo en concentraciones de sacarosa crecientes del 10, 20 y 30%, cada una durante 24 horas. Posteriormente se realizaron cortes histológicos en secciones de 50µm con ayuda de un criostato (MICROM HM 505N) a una temperatura de -24°C de las siguientes estructuras:

Se realizaron cortes de 50 micras Hipotálamo anterior central (AHC) y núcleo paraventricular (PaV) (-1.92 mm); Amígdala lateral (LA), medial (MeA) y central (CeA) (-2.40mm -2.64 mm); Hipotálamo dorsomedial DMD (-3.00 mm).

### Inmuno-histoquímica

Primera fase:

- Los cortes del Hipotálamo y la amígdala fueron sometidos a tres lavados de 10 minutos cada uno en buffer de fosfatos salino (PBS)
- Posteriormente fueron pasados por una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% durante 10 minutos, esto ayuda a eliminar la actividad endógena de las peroxidasas
- Lavado de las muestras con PBS (tres lavados de 10 min, cada uno), secado de muestras con gasa.
- Suero normal de cabra al 30% (Vector Labs. Burlingame CA, EUA) en PBT (buffer de fosfatos con tritón al 0.3%) durante 1 hora. Finalmente se le agregó el

anticuerpo primario para c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA EUA) diluido 1:2000 en suero normal de cabra disueltos en PBT al 0.3%, durante 72 horas en cámara húmeda refrigerada (4° C).

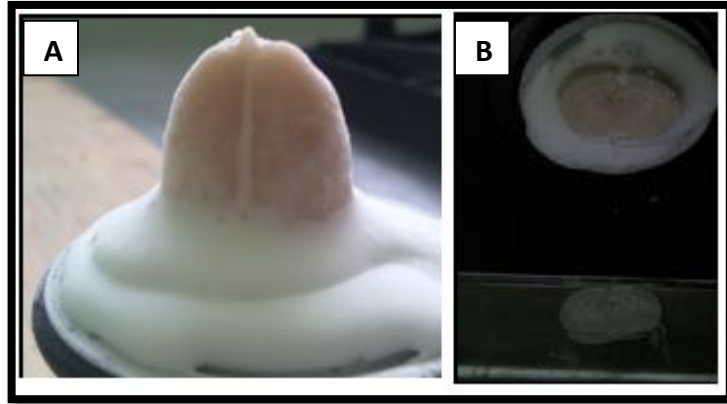


Fig. 10: A: Cerebro fijado con una base de gel, para cortar en el criostato. B: Corte histológico del cerebro

#### Segunda fase:

- Posterior a la incubación con el primer anticuerpo, los cortes histológicos se sometieron a lavados con PBT (tres 10 minutos cada uno)
- Después se agregó el anticuerpo secundario biotilnado (anti conejo) hecho en cabra (Vector Labs. Burlingame CA, EUA) diluido 1:200 en PBT, durante una hora
- Lavados en PBS (tres de 10 minutos cada uno).
- El tejido fue incubado en el complejo Avidina-Biotina HRP (1:250 Vector Labs. Burlingame CA, EUA) por una hora.
- Concluido dicho proceso se realizó tres lavados en PBS.
- Posteriormente la localización de la proteína Fos fue revelado con una solución 0.05% de diaminobencidina (Polyscience, Warrington, PA EUA) en presencia de sulfato de níquel (10 mg/ml Fisher Scientific, Pittsburg PA EUA) cloruro de cobalto (10 mg/ml Fisher Scientific Pittsburg PA EUA) y 0.01% de peróxido de hidrógeno, lo que produce un precipitado púrpura-negrusco.
- Por último las laminillas fueron lavadas en agua destilada dos veces durante tres minutos, luego deshidratadas en alcoholes al 70%, 90% y finalmente en alcohol al

100%. Una vez que se han secado, las laminillas serán montadas con Permount (Fisher Scientific) y observadas al microscopio.

Para el análisis histológico se utilizó un microscopio Olympus BX41 el cual tiene adaptada una cámara a color con sistema de enfriamiento (Evolution VF de Media Cybernetics Bethesda MD). Y un software analizador de imágenes Image Pro Plus (Media Cybernetics Bethesda MD) con el que se puede hacer un conteo automatizado del número de neuronas que resulten inmunorreactivas a Fos en cualquier área del cerebro (Albretchet *et al.*, 2009; Lamprea *et al.*, 2002; Paxinos & Watson, 2005).

## **7.1 Análisis Estadístico.**

Para los datos conductuales se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para el % EBA, %TBA y número total de entradas (TE), si las diferencias eran significativas se realizó un análisis de LSD para determinar las diferencias entre pares de grupos.

El número de neuronas se analizó con un ANOVA de una vía, el cual proporciona las diferencias significativas entre grupos y contexto. Los resultados del número de neuronas fueron graficados de acuerdo a la información obtenida mediante el ANOVA tomando en cuenta el promedio de neuronas por estructura, contexto, media y desviación estándar entre ellas.

## 8.RESULTADOS

### Conductuales

En los grupos de administración aguda se encontraron diferencias significativas en el % de EBA ( $F_{(2, 17)}=3.771$ ,  $p<0.05$ ) donde el grupo AML difirió del grupo ASL ( $p<0.05$ ) como se ve en la Fig. 13. En el % de TBA se observaron efectos similares ( $F_{(2, 17)}=3.5400$ ,  $p<0.05$ , donde el grupo AML difirió del grupo ASL ( $p<0.05$ ) (Fig. 11).

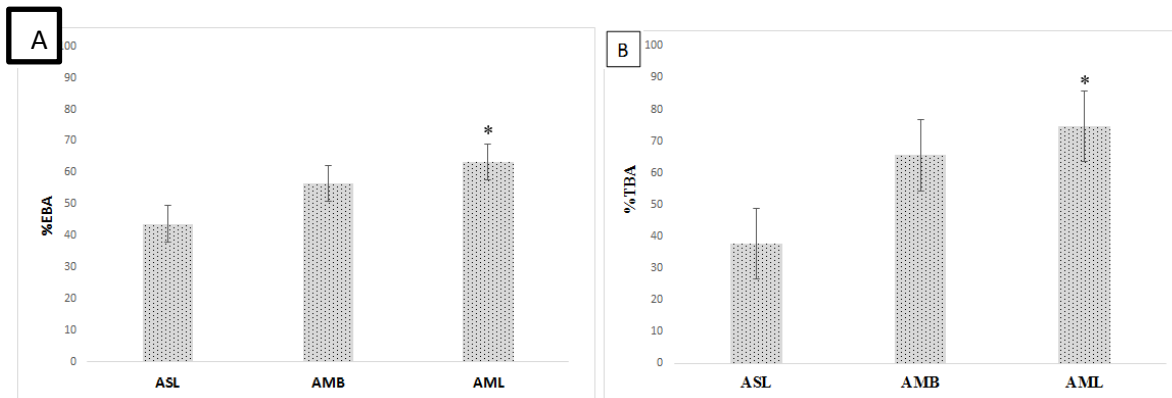


Fig. 11: Media  $\pm$  EEM después de la administración aguda de M (1 mg/kg, ip) en contexto bioterio (AMB) y laboratorio (AML). A: % EBA, (\* $p<0.05$  vs Salina (ASL)); B: % TBA (\* $p<0.05$  vs Salina (ASL)).

Como puede verse en la Fig. 12, los grupos de administración crónica se encontraron diferencias significativas entre los grupos en % EBA ( $F_{(3, 27)} = 7.1771, p < 0.001$ ), donde el grupo CMB difirió de todos los grupos crónicos de salina en cada contexto CSL, CSB ( $p < 0.01, 0.001$  respectivamente) y del grupo CML ( $p < 0.01$ ). En el % de TBA se observó un efecto similar ( $F_{(3, 27)} = 5.1837, p < 0.001$ ), donde el grupo CMB difirió de los grupos de salina en ambos contextos ( $p < 0.01$ ).

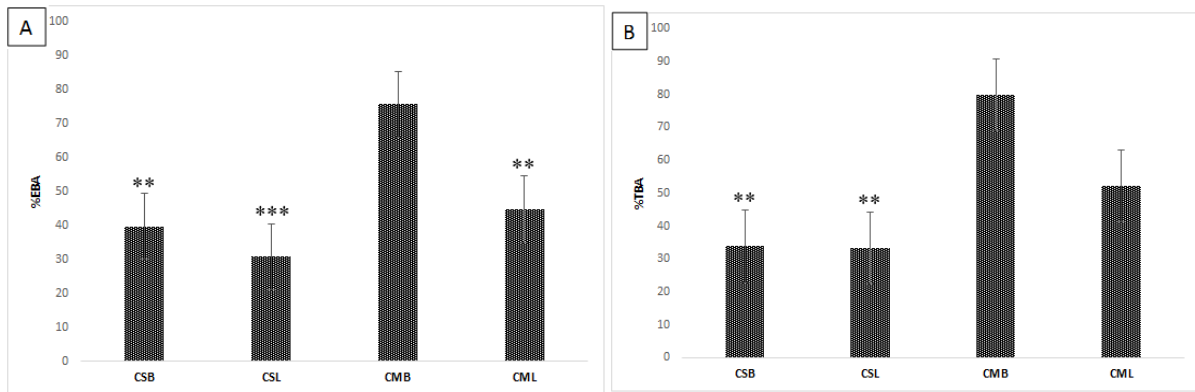


Fig. 12: Media  $\pm$  EEM, después de la administración crónica de M (1 mg/kg, ip) en contexto bioterio (CMB) y laboratorio (CML). A: % EBA, (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  CMB); B: % TBA (\*\* $p < 0.01$  CMB,  $p < 0.01$ ).

Cuando los grupos recibieron durante 20 días midazolam y el día de la prueba no se le administró (abstinencia) se observaron diferencias significativas entre los grupos en % EBA ( $F_{(5, 38)}=5.5986$ ,  $p<0.001$ ), donde el grupo CMB difirió de los grupos, MAbB ( $p<0.001$ ) y MAbL ( $p<0.01$ ). En el % de TBA ( $F_{(5, 38)}=5.7578$ ,  $p<0.001$ ) se observó un efecto similar en los grupos MAbB y MAbL ( $p<0.001$ ) donde el grupo CMB difirió del grupo CML ( $p<0.05$ ), (Fig. 13).

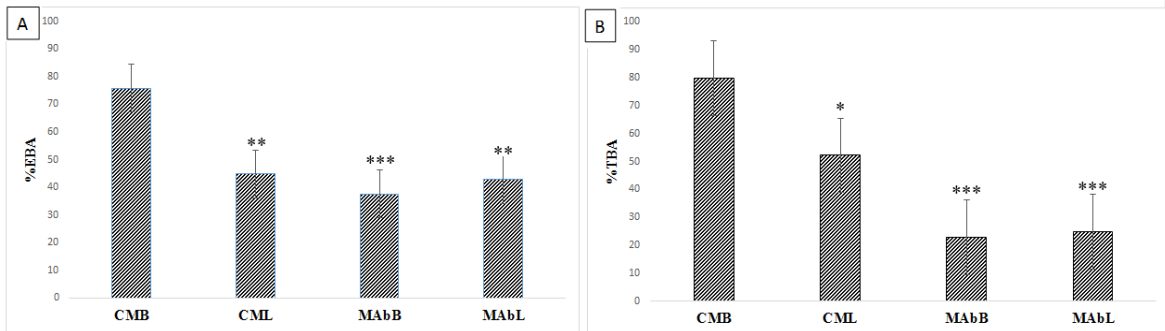


Fig. 13: Media  $\pm$  EEM, A: %EBA, después de no administrar M antes de LEC (1 mg/kg, ip) en contexto bioterio (MAbB) y laboratorio (MAbL). (\*\* $p<vs$  0.01, \*\*\*0.001)Crónico M (CMB). B: %TBA (\*  $p<vs$  0.05, \*\*\*0.001Crónico M (CMB).

En los grupos de administración crónica con M y el flumazenil que bloquea la acción farmacológica de BZD, se encontraron diferencias significativas entre los grupos en % EBA ( $F_{(3, 26)}=4.8629$ ,  $p<0.001$ ). El grupo CMB difirió de los grupos CML, CMFB ( $p<0.01$ ), CMFL ( $p<0.001$ ). En el % de TBA se observaron efectos similares ( $F_{(3, 26)}=3.0751$ ,  $p<0.05$ ), donde los grupos CMFB y CMFL difirió del grupo CMB ( $p<0.05$ ) (Fig. 14).

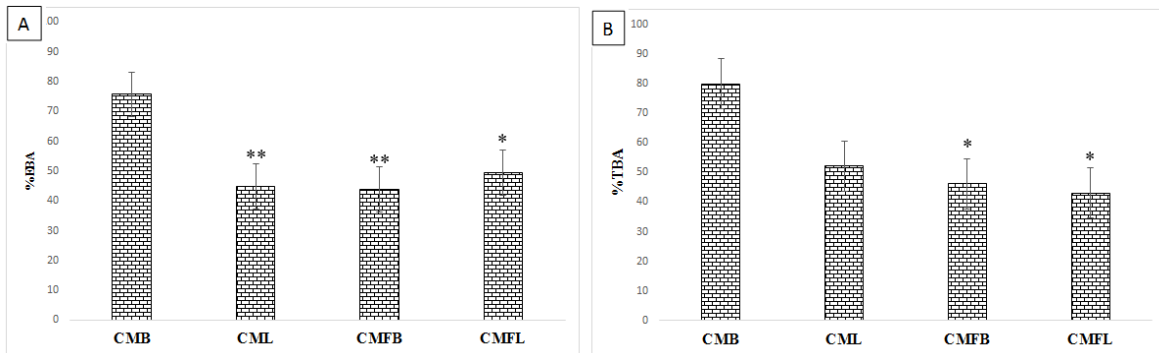


Fig. 14: Media  $\pm$  EEM, A: %EBA, después de la administración crónica de M con F (1 mg/kg, ip) en contexto bioterio (CMFB) y laboratorio (CMFL), (\*\* $p<$  vs 0.05, \*\*0.01 CMB); B: %TBA (\* $p<$  vs 0.05, CMB).

## **c-Fos**

### Expresión del # de neuronas positivas en núcleos del hipotálamo:

#### AHC:

En los grupos con administración de M existen diferencias significativas en la expresión del gen Fos ( $F_{(8, 26)}=5.7394, p<0.001$ ), el grupo ASL difirió de los grupos AMB, AML, CMB y MAbB ( $p$ 's  $<0.01, 0.001$ ) como se observa en la Fig. 15. Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión del gen Fos comparado en el grupo salina, con medias de  $122\pm 25$  en grupo AMB y  $133\pm 12$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica se encontraron diferencias por contexto, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto bioterio CMB ( $\bar{X}=126\pm 46$ ) similar al de los grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=260\pm 36$ ), no presentó diferencias significativas.

En los grupos de abstinencia también se detectaron diferencias por contexto, el grupo MAbB ( $\bar{X}=114\pm 36$ ) mostró menor expresión de c-fos y difirió significativamente del grupo de salina, mientras el grupo MAbL ( $313\pm 36$ ) no difirió del grupo salina.

La administración de flumazenil no produjo diferencias significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo CMFB mostró una media de  $246\pm 1$  y el grupo CMFL una media de  $224\pm 29$ .

#### PaV:

En la administración de M, se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen Fos ( $F_{(8, 22)}=15.689, p<0.001$ ). El grupo ASL difirió de los grupos AMB, AML, CMB, MAbB, MAbL y CMFL ( $p$ 's  $<0.01, 0.001$ ) como se observa en la figura 15. Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión de c-fos comparado con el grupo salina, con medias de  $108\pm 12$  en grupo AMB y  $102\pm 12$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica se encontraron diferencias por contexto, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las

administraciones en el contexto bioterio CMB ( $\bar{X}=241 \pm 38$ ) similar al de los grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=241 \pm 32$ ), también presentó diferencias significativas.

En los grupos de abstinencia se detectaron diferencias por contexto, el grupo MAbB ( $\bar{X}=26 \pm 2.7$ ) mostró menor expresión del gen Fos, difiriendo significativamente del grupo salina, mientras el grupo en contexto laboratorio MAbL ( $301 \pm 12$ ) también difirió del grupo control.

La administración de flumazenil produjo diferencias significativas por contexto, se observó una disminución de la expresión del gen Fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto bioterio CMFB ( $\bar{X}=259 \pm 27$ ), similar con el grupo salina, pero sin presentar significancias, mientras que el grupo en contexto laboratorio CMFL ( $\bar{X}=308 \pm 6.3$ ) presentó significancias con el grupo salina.

#### DMD:

En la administración de BZD como el M, se encontraron diferencias significativas entre los grupos con expresión del gen Fos en esta área ( $F_{(8, 29)}=3.5734$ ,  $p<0.001$ ). El grupo ASL difirió de los grupos AMB, AML, CMB y MAbB ( $p$ 's  $< 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ), como se observa en la figura 15.

Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión del gen Fos comparado en el grupo salina, con medias de ( $\bar{X}=111 \pm 13$ ) en grupo AMB y  $93 \pm 15$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica se encontraron diferencias por contexto, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto bioterio CMB ( $\bar{X}=145 \pm 53$ ) ligeramente mayor al de los grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=259 \pm 40$ ), no presentó diferencias significativas.

En los grupos de abstinencia también se detectaron diferencias por contexto, el grupo MAbB ( $\bar{X}=145 \pm 1.7$ ) mostró menor expresión de c-fos, similar al grupo crónico en contexto bioterio, difiriendo significativamente del grupo de salina, mientras el grupo MAbL ( $228 \pm 7.6$ ) no difirió del grupo salina.

La administración de flumazenil no produjo significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo CMFB mostró una media de  $251 \pm 18$  y el grupo CMFL una media de  $247 \pm 18$ .

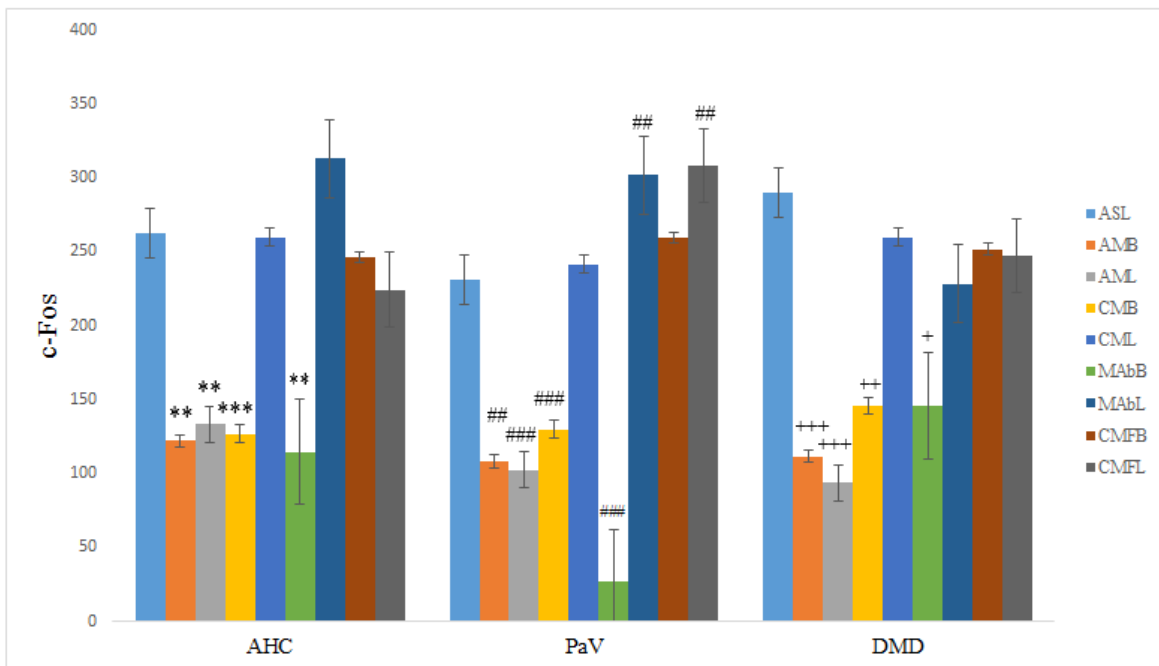


Fig. 15: Media  $\pm$  EEM de expresión de c-Fos medidas en núcleos del hipotálamo después de las administraciones agudas y crónicas de M (1mg/kg) en diferentes contextos. \*\*\*p's<0.01, 0.001 vs. Salina en AHC. (ASL). \*\*\*p's<0.01, 0.001 vs Salina en PaV. \*\*\*p's< 0.05, 0.01, 0.001 vs. Salina en DMD.

### Expresión del # de neuronas positivas en núcleos de la amígdala:

#### MePD:

En los grupos con administración de M, existen diferencias significativas en la expresión del gen Fos ( $F_{(8, 26)}=3.1832$ ,  $*p<0.05$ ). El grupo ASL difirió del grupos AMB y AML ( $p<0.05$ ), como se observa en la Fig. 16. Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión del gen Fos comparado en el grupo salina, con medias de  $95 \pm 17$  en grupo AMB y  $92 \pm 38$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica no se encontraron diferencias, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto bioterio CMB ( $\bar{X}=145 \pm 53$ ) similar al de los grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=259 \pm 40$ ), se observó una expresión similar al grupo salina.

En los grupos de abstinencia no produjo significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo MAbB mostro una media de  $94 \pm 37$  y el grupo MAbL una media de  $247 \pm 50$ .

La administración de flumazenil al igual que la de abstinencia no produjo significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo CMFB mostró una media de  $197 \pm 19$  y el grupo CMFL una media de  $247 \pm 15$ .

#### MePV:

En los grupos con administración de M, se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(8, 27)}=10.50$ ,  $p'<0.01$ ,  $0.001$ ), el grupo control (ASL) difirió de los grupos AMB, AML, CMB y MAbB como se observa en la Fig. 16. Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión del gen Fos comparado en el grupo salina, con medias de  $78 \pm 11$  para el grupo AMB y  $121 \pm 6$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica se encontraron diferencias por contexto, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto bioterio CMB ( $\bar{X}=154 \pm 21$ ) ligeramente mayor al de los

grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=197 \pm 61$ ), no presentó diferencias significativas.

En los grupos de abstinencia también se detectaron diferencias por contexto, el grupo MAbB ( $\bar{X}=74 \pm 34$ ) mostró menor expresión de c-fos, similar al grupo agudo en contexto biterio, difiriendo significativamente del grupo de salina, mientras el grupo MAbL ( $291 \pm 12$ ) no difirió del grupo salina

La administración de flumazenil no produjo diferencias significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo CMFB mostró una media de  $201 \pm 27$  y el grupo CMFL una media de  $245 \pm 17$ .

Ce:

En los grupos con administración de M, se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(8, 29)}=6.5860, p'<0.01, 0.001$ ), el grupo control (ASL) difirió de los grupos AMB, AML, CMB y MAbB como se observa en la Fig. 16. Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión del gen Fos comparado en el grupo salina, siendo el grupo en contexto laboratorio que presenta menor expresión, con medias de  $103 \pm 23$  para el grupo AMB y  $60 \pm 28$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica se encontraron diferencias por contexto, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto biterio CMB ( $\bar{X}=127 \pm 38$ ) ligeramente mayor al de los grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=279 \pm 4$ ), no presentó diferencias significativas.

En los grupos de abstinencia como en los grupos con flumazenil, no se produjo diferencias significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo MAbB mostro una media de  $110 \pm 6$  y el grupo MAbL.

En los grupos de flumazenil también se detectaron diferencias por contexto, el grupo CMFB ( $\bar{X}=247 \pm 18$ ) mostró menor expresión de c-fos, similar al grupo salino sin presentar diferencias significativas, mientras el grupo CMFL ( $272 \pm 17$ ) difirió del grupo salina mostrando diferencias significativas.

La:

En los grupos con administración de M, se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $F_{(8, 28)}=10.54$ ,  $p'<0.01$ ,  $0.001$ ), el grupo control (ASL) difirió de los grupos AMB, AML, CMB y MAbB como se observa en la Fig. 16. Los grupos con administración aguda en ambos contextos mostraron menor expresión del gen Fos comparado en el grupo salina, con medias de  $72 \pm 18$  para el grupo AMB y  $57 \pm 13$  en el grupo AML.

En los grupos con administración crónica se encontraron diferencias por contexto, se observó una disminución de la expresión de c-fos en el grupo que recibió las administraciones en el contexto bioterio CMB ( $\bar{X}=78 \pm 17$ ) similar al de los grupos agudos con M, mientras que el grupo del contexto laboratorio CML ( $\bar{X}=263 \pm 43$ ), no presentó diferencias significativas.

En los grupos de abstinencia también se detectaron diferencias por contexto, el grupo MAbB ( $\bar{X}=130 \pm 5$ ) mostró menor expresión de c-fos, difiriendo significativamente del grupo de salina, mientras el grupo MAbL ( $211 \pm 8$ ) no difirió del grupo salina

La administración de flumazenil no produjo significativas con el grupo control en ningún contexto, el grupo CMFB mostró una media de  $163 \pm 18$  y el grupo CMFL una media de  $233 \pm 16$ .

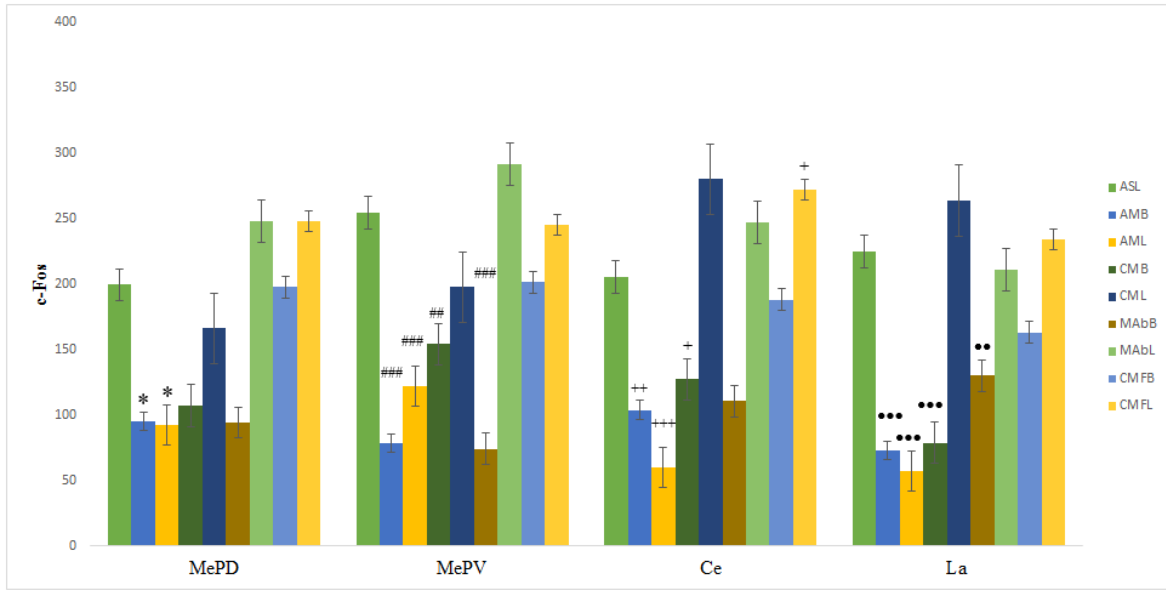


Fig. 16: Media  $\pm$  EEM de expresión de c-Fos medidas en núcleos de la amígdala después de las administraciones agudas y crónicas de M (1mg/kg) en diferentes contextos. \*p 0.05 < vs. Salina en MePD. # p's < 0.001, 0.01 vs. Salina en MePV. +p's < 0.001, 0.01, 0.05 vs. Sal en Ce. •p's < 0.001, 0.01 en La.


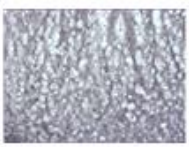



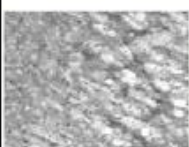

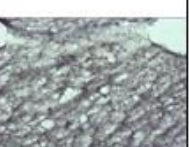




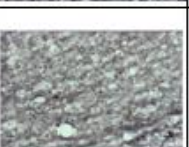
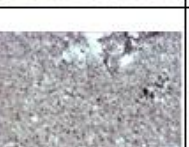

Estructura	ASL	AML	CML	MAbL	CMFL
AHC					
PaV					
DMD					

Fig. 17: Expresión de neuronas positivas a c-Fos en núcleos del hipotálamo en contexto laboratorio




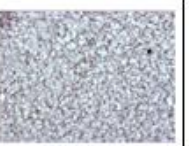













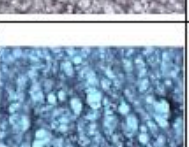


Estructura	ASL	AML	CML	MAbL	CMFL
MePD					
MePV					
Ce					
La					

Fig. 18: Expresión de neuronas positiva a c-Fos en núcleos de la amígdala en contexto laboratorio.

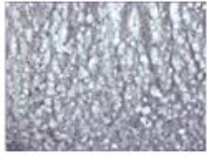



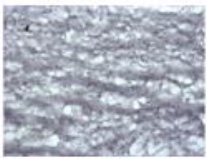
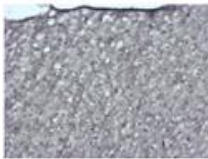
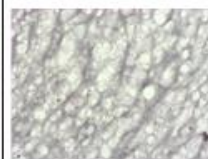
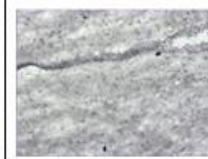

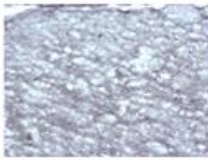


Estructura	AMB	CMB	MABB	CMFB
AHC				
PaV				
DMD				

Fig. 19: Expresión de neuronas positivas a c-Fos en núcleos del hipotálamo en contexto bioterio.

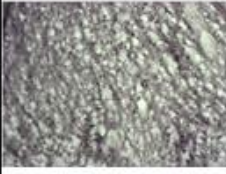
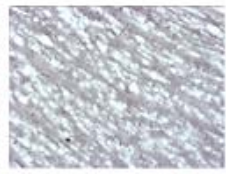

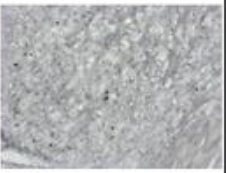

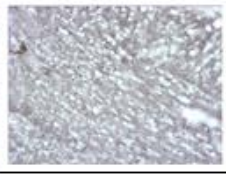

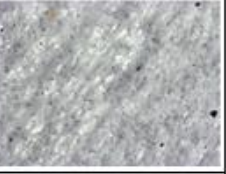

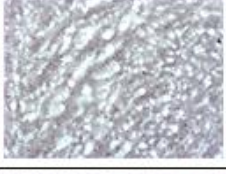

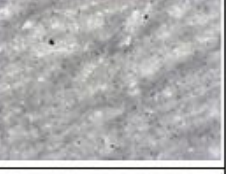




Estructura	AMB	CMB	MABB	CMFB
MePD				
MePV				
Ce				
La				

Fig. 20: Expresión de neuronas positivas a c-Fos en núcleos de la amígdala en contexto bioterio.

---

## 9. DISCUSION

La administración aguda de M tiene efectos ansiolíticos, debido a que los sujetos sometidos a este tipo de tratamiento difiriendo del contexto, presentando mayor actividad en los brazos abiertos, lo cual normalmente les resulta aversivo y les provoca ansiedad, dichos efectos coinciden con los que menciona Baptista et al., (2007) sobre el efecto ansiolítico de BZD; además otra prueba de ello es que la expresión de c-fos se vio disminuida en estructuras cerebrales relacionadas con la ansiedad como lo es el hipotálamo y la amígdala a este tipo de administración.

La administración crónica de Midazolam, produce tolerancia y aumenta la expresión de c-fos dependiendo del contexto. Resulta necesario considerar el desarrollo de tolerancia a BZD mencionado por File (1985), porque lo encontrado en este trabajo indica que la presencia del síndrome de abstinencia puede estar fuertemente relacionada con el tipo de tolerancia asociativa al contexto, puede ser específico de los estímulos discriminativos al encontrarse en el contexto habitual de administración, los sujetos presentaron mayor nivel de abstinencia.

La administración de Flumazenil mostro disminución en la entrada a brazos abiertos como la expresión de c-fos al bloquear el M en la última administración, en comparación con las dosis crónicas esto sugiere un efecto de tipo ansiogenico.

A pesar de que la actividad de c-fos aumenta diferencialmente en varios modelos de ansiedad, la amígdala se activa específicamente. Por otro lado, algunos informes describen un efecto inhibitor de las benzodicepinas sobre la actividad de c-fos inducida por la ansiedad en áreas hipotalámicas. Sin embargo la activación inespecífica de la amígdala ha sido detectada después de la administración de fármacos ansiogenicos y ansiolíticos con diferentes mecanismos de acción.

En los resultados obtenidos se mostró el efecto ansiolítico de midazolam después de su administración y fue evidente al analizar el porcentaje de entradas y permanencias en el laberinto de brazos abiertos (0,5 mg/kg ip) señalado en Albrechet *et al.*, 2009, donde la detección de peligro genera fuerte evasión a los brazos abiertos administrando BZD, esto coincide con lo encontrado por nosotros en los grupos administrados de forma aguda en contexto bioterio ya que en contexto laboratorio se encontró un porcentaje mayor, también observamos una menor expresión de c-Fos, en la amígdala que juega un papel en la memoria emocional así como el hipotálamo lo es de la memoria declarativa como lo menciona Sánchez & Román (2004). Existen fuertes conexiones anátomo-fisiológicas entre la amígdala y el hipotálamo asociadas a la ansiedad mencionado por Canteras *et al.*, (1995) y Price (2003).

En la administración de tipo crónica se detectó tolerancia, cuando se evaluaron los sujetos en el mismo contexto pero no en diferente contexto de administración, lo que confirma los resultados anteriores. El uso crónico produce tolerancia y dependencia, fenómenos relacionados en forma importante con la farmacodinamia de estos fármacos mencionado por File (1992) el mismo autor también menciona las diferencias significativas entre dos grupos con dosis repetidas en distinto contexto (1982). En nuestros resultados observamos diferencias entre contextos, siendo mayor la entrada en brazos abiertos en contexto bioterio, mostrando de esta manera la tolerancia farmacológica. También encontramos como Medeiros, Reis & mello, (2005) tolerancia en la expresión de c-fos que disminuye con administraciones repetidas de BZD, en nuestro caso encontramos tolerancia con administraciones crónicas, siendo esta dependiendo del contexto. El patrón de activación de c-fos mostro cambios importantes en amígdala e hipotálamo, los cambios también dependían de los días de administración y el contexto de administración del fármaco, los resultados sugieren que la ansiedad y la tolerancia al contexto específico, también modifica la actividad neuronal en las diferentes regiones del SNC.

El efecto en el síndrome de abstinencia presento menor actividad en los brazos abiertos comparado con la administración de tipo crónico. La presencia del síndrome de abstinencia

se manifiesta un incremento de la expresión del gen Fos y en esto encontramos relación con Hayward *et al.*, (1990) que menciona el síndrome de abstinencia como factor ansiogenico reflejado en la expresión de c-fos. Dicha expresión se encuentra relacionada con el desarrollo de la tolerancia; en el caso de este estudio se observó que el grupo que fue sometido a administración crónica y probado en el LEC (el día de la prueba sin administración del fármaco) en el contexto en el cual había recibido la administración crónica presento mayor expresión de c-fos que el que recibió la administración crónica en un contexto diferente al de la prueba.

La administración crónica con M y el flumazenil, bloquea la acción farmacológica de BZD actuando por inhibición competitiva de la unión de estos fármacos mencionada por Valsecia & Malgor (2002), dando un efecto ansiogenico debido a que los sujetos sometido a este tipo de tratamiento presentaron menor actividad en brazos abiertos comparando con la administración crónica con M.

La presencia de F manifiesta una disminución de la expresión del gen Fos encontramos relación con lo descrito por Woods (1995) que menciona el efecto antagonista de flumazenil para la disminución de ansiedad, bloqueando los efectos de BZD. Dicha expresión se encuentra relacionada con el desarrollo de tolerancia; en el caso de este estudio se observó que los grupos sometidos, presentaron disminución en la expresión del gen Fos en ambos contextos.

---

## 10. Conclusión

- La administración aguda de midazolam tiene efectos ansiolíticos y provoca una menor expresión de c-fos en el hipotálamo y la amígdala. La administración crónica de midazolam produce tolerancia y aumenta la expresión de c-fos dependiendo del contexto.
- La presencia del síndrome de abstinencia puede estar fuertemente relacionada con el tipo de tolerancia asociativa al contexto y puede ser específico de los estímulos discriminativos al encontrarse en el contexto habitual de administración, los sujetos presentaron mayor nivel de abstinencia. 1
- La administración de flumazenil en dosis crónicas sugiere un efecto de tipo ansiogenico, mostrando disminución en la entrada a brazos abiertos, así como la expresión de c-fos al bloquear la acción del fármaco.
- A pesar de que la actividad de c-fos aumenta diferencialmente en varios modelos de ansiedad, la amígdala se activa específicamente

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Albrechet-Souza, L., Borelli, K. G., Carvahlo, M. & Brandão, M. L. 2009. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and fos immunoreactivity. *Neuroscience*, 164, 387–397.

Angst, J., Vollrath, M., Meriangas, K. R., Emst, C. 1990. Comorbidity of anxiety and depression in the Zurich cohort study of young adults. En: Maser, J.D., Cloninger, C.R., ed. *Comorbidity of mood and anxiety disorders*. Washington D.C.: American Psychiatric Press.

Ashton, H. 1994. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* Jul; 48: 25-40.

Ashton, H. 1995. Toxicity and adverse consequences of benzodiazepine use. *Psychiatric Annals*. Volumen 25: pp. 158-165

Ashton, H. 2002. Las benzodiazepinas; cómo actúan en el organismo. Capítulo 2. Las benzodiazepinas:Cuál es su mecanismo de acción y como suspender la ingestión. Edited by Hodgson & Illius. International. Argentina. pp. 60-100

Ashton, H. 1994. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* Jul; 48: 25-40.

Ator, N. A. 2005. Contributions of GABAA receptor subtype selectivity to abuse liability and dependence potential of pharmacological treatments for anxiety and sleep disorders. *CNS Spectr* pp. 31-39.

Baptista, F. L., Ferreira, R., Cabral, A., Moreno, C. V., Lira, B. M. & Nobre, M. J. 2007. Brainstem áreas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Research*. 1166: 35-46.

- Bleier, R., Chon, P., Siggelkow, I. R. 1979. A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. En: Handbook of the hypothalamus. Vol. 1. Anatomy of the hypothalamus. J.P. Morgane y J. Panksepp (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 137-220.
- Brailowsky, S. 2008. Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. Capítulo 4. Fármacos usados en el tratamiento de la ansiedad, México D.F. pp. 300 206-209.
- Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. & Muller, R. 1986. Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle, 695-700.
- Breier, A. & Hommer, D. 1988. Benzodiazepine Withdrawal: Overview and Implications for the Treatment of Anxiety. American Journal of Medicine Vol. 84. pp. 1300: 985-1146.
- Breier, A., Charney, D. S., Nelson, J. C. 1984. Seizures induced by abrupt discontinuation of alprazolam. American Journal of Psychiatry. pp. 2000: 1606-1607.
- Bulach, R., Myles, P. S., Russnak, M. 2005. Double-blind randomized controlled trial to determine extent of amnesia with midazolam given immediately before general anaesthesia. Br J Anaesth 2005; 94(3):300-5. Bulach R, Myles PS, Russnak M. Double-blind randomized controlled trial to determine extent of amnesia with midazolam given immediately before general anaesthesia. Br J Anaesth 94(3):300-5.
- Caba, M., Morgado, E., Meza, E., Tovar, A. 2008. Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. Universidad Veracruzana. Ed. Mario Caba; 100: 39-61.
- Canteras, N. S., Simerly, R. B., Swanson, L. W. 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A phase study in the rat. J comp Neurology. pp. 360: 213-245
- Canteras, S. N., Resstel, B. L., Bertoglio, L. J., Carobrez, A. P., Guimarães, S. F. 2009. Behavioral Neurobiology of anxiety Anxiety and its Treatment. Current Topics in Behavioral Neurosciences, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 10: 5-6.

- Carlson, J. G. & Hatfield, E. 1992. Psychology of Emotion. Orlando, Florida: Holt, Rinehart & Winston. 25: 12-15.
- Castro, S. E., Chico, P. L. F., Portugal, R. A. 2005. Neurotransmisores del Sistema Límbico I. Amígdala. Primera Parte. Salud Mental, Vol. 28, No 6. 840-895.
- Chaves, A. 1987. Triazolam en el insomnio. Fármacos. Costa Rica. Volumen 3.pp. 61 -70.
- Compton, W. M., Thomas, F. Y., Conway, K. P., Colliver J. 2005. Developments in the Epidemiology of Drug Use and Drug Use Disorders. The American Journal of Psychiatry, Vol. 162, N° 8; 162: 1494-1502.
- Cooper, J. R., Floyd, E. B., Roth, R. H. 2011. The Complete Story of the Benzodiazepines, seventh edición (enEng), USA: Oxford University.26-08.
- Corsi, P.S., Visvader, J., Ferland, L., Mellon, P. L., Verma, I. M. 1988. Induction of proto-oncogene fos transcription through the element adenylatecyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive. Genes Dev. 2: 1529-1538.
- Crawley, Y. & Chapouthier, G. 1998. Biological basis of anxiety. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. pp. 120: 623-633.
- Cruz-Morales, S.E., Santos, N. R., & Brandão, M.L. 2002. One trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze in the rat. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 72, 973-978.
- Curran, T., & Teich, N. M. 1982. Identification of a 39,000-dalton protein in cells transformed by the FBJ murine osteosarcoma virus. Virology 116, 221-35. Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. & Verma, I. M. 1984. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 36, 259-68.

- Curran, T., Miller, A. D., Zokas, L. & Verma, I. M. 1984. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 36, 259-68.
- Davis, M & Whalen, P. J. 2001. The amígdala: Vigilance and emotion. *Mol Psychiatry*. pp. 13-34
- Decavel. C., Van den Pol A. N. (1990) GABA: a dominant transmitter in hypothalamus. *J Comp Neurobiol* **302**:1019–1037.
- Eaton, W. W. 1995. Progress in the Epidemiology of anxiety disorders. *Epidemiology Review* 1995; 17:32-38.
- File, S. E. & Zangrossi, H. Jr. 1993. “One trila tolerance” to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state. *Psychopharmacology*. Berlin. 110, 240-244.
- File, S. E. 1982. Development and retention of tolerance to the sedative effects of chlordiazepoxide: Role of apparatus cues. *Eur J ClinPharmacol*, 81, 637-643.
- File, S. E. 1992. Use full ness of animal models with newer anxiolytics. *Clinical Neuropharmacology* 15: 525A-526A.
- Fors, L.M., Quesada, V. M., Peña, A.D. 1995. La psiconeuroinmunología, una nueva ciencia en el tratamiento de enfermedades. Revisiónbibliográfica, *Rev. Cubana Invest Biomed*. Fourth generation of Progress edited by Floyd E Bloom and David J Kupfer. RavenPressLtd, New York. Chapter 18: 49-53.
- Francesc, P. 1996. Aproximación biológica al estudio de la emoción. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia (España). ISSN: 0212-9728. Pp. 27-32.
- Gervasini, G., Carillo, J.A., Benitez J. 2004. Importancia del citocromo P-450 en terapéutica farmacológica. Monografía. Capítulo 14. Citocromo. Madrid: Instituto de España, Real Academia de Farmacia. pp. 450: 387-418.

- Greeley, J. & Cappell, H. 1985. Associative control of tolerance to the sedative and hypothermic effects of chlordiazepoxide. *Psychopharmacology*. pp.86: 487-493.
- Rosas-Gutiérrez, I., Simón-Arceo, K., Mercado, F. 2013. Mecanismo celular y molecular de la adicción a las benzodiazepinas. Vol. 36, No. 4; pp. 400: 325-329.
- Halsban, S. E. 2000. Consideraciones acerca de la neurobiología de la ansiedad. Capítulo 10. Información científica. pp. 150: 26-30.
- Hayward, M. D., Duman, R. S. & Nestler, E. J. 1990. Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain research*. pp. 525: 256-266.
- Herdegen, T. & Leah, J. D. 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28**, 370-490.
- Hevers, W., Lüddens, H. 1998 The diversity of GABA<sub>A</sub> receptors: pharmacological and electrophysiological properties of GABA<sub>A</sub> channel subtypes. *Mol Neurobiol* **18**:35–86.
- Hoffman, G.E., Smith, M.S., Verbalis, J.G. 1993. C-FOS and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*. 14: 173-213.
- Hommer, D, W., Skolnick, P., Paul, S. M. 1987. The Benzodiazepine/GABA receptor complex and anxiety. En: Meltzer HY, ed. *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. New York: RavenPress. pp. 977: 83-86.
- Jenike, M. A.: *Psychoactive drugs in the elderly: Antipsychotics and anxiolytics*. *Geriatrics*. 1988; 43 (Sep.): 53-65. 7.

- Jonas, J. M., Cohon, M. S. 1993. A comparison of the safety and efficacy of alprazolam versus other agents in the treatment of anxiety, panic and depression: a review of the literature *J ClinPsychiat* 1993; 54:25-48.
- Katzung, B.G. 1995. *Basic & Clinical Pharmacology*. Chapter V. Pharmacology. Sixth Ed. East Norwalk, CT: Appleton and Lange. pp. 125: 70-84.
- King, D. A., Bouton, M. E., & Musty, R. E., 1987. Associative control of tolerance to the sedative effects of a short-acting benzodiazepine. *Behavioral Neuroscience*, 101, 104-114.
- Kovács, K. J. 2008. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20, 665-72.
- Lader, M. 1987. Clinical Pharmacology of Benzodiazepines. *Ann. Rev. Med.* 1987; 38: 19-28. 8. Lader, M.: Rational use of Anxiolytic Drugs. *Rational Drug Ther.* 21(9):1-5. 9.
- Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Vianna, D. M., Castilho, V. M., Cruz-Morales, S. E. & Brandão, M. L. 2002. The distribution of fosimmunoreactivity in rat following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *BrainResearch*, 950, 186-194.
- Landazuri, M. A. 1989. Efectos de la contaminación en la conducta humana. *ICYT*. 11:5-9.
- Larson S. & Siegel S. 1998. Learning and tolerance to the ataxic effect of ethanol. *Pharmacology Biochemistry and behavior*, 61, 131-142.
- Lee, W., Haslinger, A., Karin, M., Tjian, R. 1987. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature*, 325, 368-72.
- Leonard, B. E. 1999. Therapeutic applications of benzodiazepine receptor ligands in anxiety. *Human PsychopharmacolClinExp* 1999; 14:125-35.

- López, M. D. I., Vsldovinos, Y. A., Méndez, D. M., Mendoza, F. V. 2009. El Sistema Límbico y las Emociones: Empatía en Humanos y Primates *Psicología Iberoamericana*. México DF, vol. 17, núm. 2. pp. 60-69.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I. 2005. *Farmacología básica y clínica*. 17ª edición. Madrid: Editorial Medica Panamericana. pp. 120: 20-25.
- Martin, M. L., Lieberman, P. M. & Curran, T. 1996. Fos-Jun dimerization promotes interaction of the basic region with TFIIE-34 and TFIIF. *Mol Cell Biol*16, 2110-8.
- Martindale. 1982. *The Extra Pharmacology*. 28a edition. England: The Pharmaceutical Press. pp. 792-819 y 1504-1563.
- McCann, U. D., Thorne, D., Hall, M. 1995. The effects of L Dihydroxyphenylalanine on alertness and mood in  $\alpha$ -Methylpara-tyrosine-treated healthy humans: Further evidence for the role of catecholamines in arousal and anxiety. *Neuropsychopharmacology*1995; 13:41-5.
- Medeiros, M. A., Reis, L. C. & Mello, L. E. 2005. Stress-Induced c-Fos expression in differentially modulated by dexamethasone, diazepam and imipramine. *Neuropsychopharmacology*. pp. 1246-1256.
- Meister B. 1993. Gene expression and chemical diversity in hypothalamic neurosecretory neurons. *Mol Neurobiol* 7:87-110.
- Mendelson, W. 1987. Pharmacotherapy of Insomnia. *Psychiatric Clinics of North America*. pp. 555-563.
- Milde-Langosch, K. 2005. The Fos family of transcription factors and their role in tumorigenesis. Chapter II. *Cancer*. 41, 2449: 58-61.
- Morón, R. F. G., Borroto, R. R., Calvo, B. D. M., Cires, P. M, Cruz, B. M. A., Fernández G. A. 2009. *Farmacología clínica*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas 1-30.

- Olsen, R.W., Tobin, A.J. 1990. Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. Richards G, P Schoch, F Jenck. Benzodiazepine receptors and their ligands. FASEB; 4:1469: 80.
- Palkovits, M., Zeborsky, L. 1979. Neural connections of the hypothalamus. En: Handbook of the hypothalamus. Vol. 1. Anatomy of the hypothalamus. J.P. Morgane y J. Panksepp (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, pp. 379-509
- Parmigiani, S., Palanza, P., Rodgers, J., Ferrari, P.F. 1999. Selection, evolution of behavior and animal models in behavioral neuroscience. *Neuroscience Biobehavior Review*, 23:957-970.
- Paxinos, G., & Watson C. 2009. The rat brain: In stereotaxic coordinates. Chapter LXIII. Figures. Edited by Elsevier Inc. International. New York, USA. pp. 46-57.
- Pellow, S., File, S. E. 1985. Anxiolytic and anxiogenic drug effect son exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behavior*, 24: 525-529.
- Pérez, H. B. G. 2002. Reacciones adversas a los medicamentos y adicción a otras sustancias. En: Morón Rodríguez FG, Levy Rodríguez M. *Farmacología General*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas. pp. 70-89.
- Price, J. L. 2003. Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann New York. Academi science*. pp. 985: 50-58.
- Qi Mei, Thomas, O. M., David, K., Denis, G. B., Gerald, J.T., Jr, 2001. Fos expression in rat celiac ganglion: an index of the activation of postganglionic sympathetic nerves. *Am J Physiological Endocrinology* pp.281.
- Ramirez, A. &, Burkle, J. 1992. Antagonismo del efecto sedante del midazolam. Estudio doble ciego, comparativo entre placebo, aminofilina y flumazenil. 15: 52-55.

- Ramsay, D.S. & Woods, S.C. 1997. Biological consequences of drug administration: Implications for acute and chronic tolerance. *Psychological Review*, 104, 170-193.
- Reyes, L. H. 1984. Anxiety Disorders: Diagnosis and Treatment. *The Elementary School Journal*, 84(5), 558-581.
- Richards, G., P., Schoch, F., Jenck. 1991. Benzodiazepine receptors and their ligands. En: Rodgers RJ, Cooper SJ, ed. 5HT1A agonists, 5HT3 antagonists and benzodiazepines. Their comparative behavioral pharmacology. Chichester UK: John Wiley & Sons Ltd. p. 1-30.
- Rodgers, R.J. & Cole, J.C. 1994. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. En: Cooper, S. J. and Endrie, C.A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. John Wiley and Sons, pp. 60: 9-44.
- Rodgers, R.J., Cooper, S.J. 1991. 5HT1A agonists: 5HT3 antagonists and benzodiazepines. Their comparative behavioral pharmacology. Chichester. Published by John Wiley & Sons.
- Rodríguez, J.F., Contreras, C.M. 1998. Algunos datos recientes sobre la Fisiopatología de los trastornos de ansiedad. Vol. 9, No. 3. pp. 50: 10-11.
- Rudolph, U. 2008. Benzodiazepines. *Encyclopedia of molecular pharmacology*. Segunda edición. Nueva York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 700: 250-260.
- Sambucetti, L. C. & Curran, T. 1986. The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science* 234, 1417-9.
- Sambucetti, L. C. & Curran, T. 1986. The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science* 234, 1417-9.

- Sánchez J.P., Román F. 2004. Amígdala, corteza prefrontal y especialización hemisférica en la experiencia y expresión emocional anuales de psicología, vol 20, nº 2. Universidad de Murcia, 223-240.
- Sassone-Corsi, P., Sisson, J. C., Verma, I. M. 1988. Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature*. pp.334:314-319.
- Setoyama, C., Frunzio, R., Liau, G., Mudryj, M. & de Crombrughe, B. 1986. Transcriptional activation encoded by the v-fosgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3213-7.
- Shur, E., Petursson, H., Checkley, S., Lader, M. 1983. Long-Term Benzodiazepine Administration Blunts Growth Hormone Response to Diazepam. *Archives General Psychiatry*. pp. 1105-1108.
- Shyu, A. B., Greenberg, M. E. & Belasco, J. G. 1989. The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev*. 3. pp. 60-72.
- Shyu, A. B., Greenberg, M. E., & Belasco, J. G. 1989. The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev*. 3:60-72.
- Siegel, S. & Ramos B.M. 2002. Applying laboratory research: drug anticipation and the treatment of drug addiction. *Exp Clin Psychopharmacol*, 10, 162-183.
- Siegel, S. 1989. Pharmacological conditioning and drug effects. Chapter 9. Tolerance and Sensitization to Psychoactive Drugs, Clifton, NJ: Human Press. New York. pp. 20.
- Sng, J. C., Taniura, H., Yoneda, Y. 2004. A tale of early response genes. *Biol Pharm Bull* 27, 606-12.
- Stephenson, F. A., Duggan, M. J., Pollard, S., Thompson, C. L. 1992. GABA receptor composition and function in relation to drug action. En: Elliott JM, Heal DV,

- Marsden CA, ed. Experimental approaches to anxiety and depression. New York: John Wiley & Sons Ltd. p. 169-82.
- Tamminga C.A. 1997. Immediate Early Genes. *Am J Psychiatry*. 154:3.
- Treit, D. 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience and Biobehavioral* 9, 203-222.
- Treit, D., Persold, C., Rotzinger, S. 1993. Dissociating the antifear effects of septal and amigdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behav Neurosci*. 1993; 107:779-85.
- Treit, D., Pinel, J.P.j., Fibiger, H.C. 1981. Conditioned defensive burying: A new paradigm for the study of anxiolytic agents. *PharmacolBiochem Behavior*, 15:619-626.
- Valsecchia, M. E., Malgor, L. A. 2002. *Farmacología médica*. Capítulo 3. Drogodependencia. Ediciones Donato/Farm. Volumen 5. 160 67-89.
- Wilson, G. M. J., Sutphen, K., Suarez, Y., Sinha, Y., Brewer, B., Villanueva-Feliciano, E. C., Ysla, R. M., Brewer, G. 2003. Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure. *J. Biology. Chemical*: 33039-33048.
- Woods, J. E., Katz, J. L., Winger, G. 1995. Abuse and therapeutic use of benzodiazepines and benzodiazepine-like drugs. In *Psychopharmacology: the fourth generation of Progress*. Edited by Floyd E Bloom and David J. Kupfer. New York. pp. 211-220.
- Xia, Y., Haddad, G. G. 1992. Ontogeny and distribution of GABA<sub>A</sub> receptors in rat brain stem and rostral brain regions. *Neuroscience* 49:973-989.
- Zoch, C. E. 1996. Transtornos ansiosos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas* 18 (2): 65-68. ISSN 02532948.

## EXPRESIÓN DEL GEN C-FOS EN DIVERSAS REGIONES CEREBRALES EN RATAS CON TOLERANCIA AL DZ

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ DJ (1), CASTILLO-ROBERTO G (1), ESTRADA C (2), MORÁN C (2), CRUZ-MORALES SE (1), (1) FES-IZTACALA, UNAM, (2) BUAP.

### INTRODUCCIÓN

Las benzodiazepinas (Bz) son ansiolíticos de primera elección, hay evidencia de que el uso crónico de estos fármacos produce tolerancia y dependencia a uno o varios de sus efectos (File, 1985). Los efectos de Bz o etanol pueden estar condicionados a las señales del contexto presentes en el momento de su administración (Larson & Siegel, 1998). La tolerancia al diazepam (D) administrado en un contexto específico puede generar cambios que pueden identificarse utilizando la expresión del gen C-Fos como indicador de actividad en diferentes núcleos neuronales (Beck & Fibiger, 1995) los cuales se activan por la presencia de estímulos ansiogénicos.

### OBJETIVO

Evaluar el efecto de la administración aguda y el desarrollo de tolerancia después de la administración crónica de diazepam (D), en ratas sometidas a una tarea de LEC, así como la expresión de C-Fos en diversas regiones del cerebro involucradas en la ansiedad.

### MÉTODO



Figura 1

### INSTRUMENTO

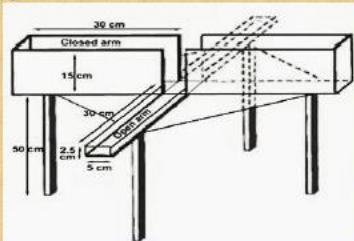


Figura 2

### RESULTADOS

La administración aguda produjo ansiólisis en la tarea de laberinto, siendo el %EBA y el %TBA mayores en los grupos agudos. Los grupos crónicos, mostraron efecto de tolerancia asociativa al contexto, pues el grupo que fue pretratado crónicamente en un ambiente distinto al de la prueba (CDB) manifestó una recuperación en la ansiólisis, mientras que con el grupo que fue pretratado en el contexto de la prueba ocurrió lo opuesto, el efecto ansiolítico fue menor. De igual modo en la expresión del gen Fos se identificó ansiólisis por el D siendo menor la expresión de Fos en los grupos agudos, y en los crónicos también se encontró tolerancia asociativa, pues sólo el grupo pretratado en el contexto de la prueba mostró recuperación de la expresión del gen Fos en la tarea de LEC, alcanzando niveles similares al grupo S, mientras el tratado en otro contexto tiene una expresión de Fos similar a los grupos agudos.

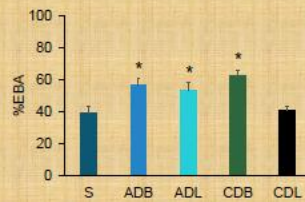


Figura 3. Media y  $\pm$ SEM del %EBA después de administraciones agudas y crónicas de D (1mg/kg). \* $p < 0.05$  vs. S.

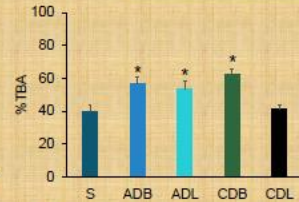


Figura 4. Media y  $\pm$ SEM de %TBA después de administraciones agudas y crónicas de D (1mg/kg). \* $p < 0.05$  vs. S.

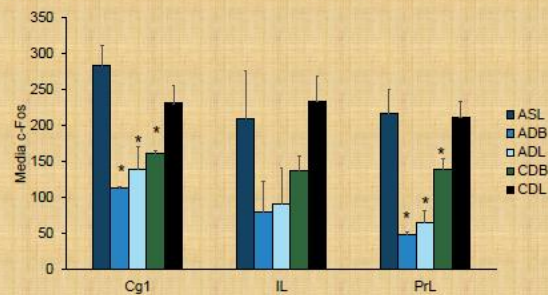


Figura 7. Media y  $\pm$ SEM de la expresión de c-Fos medida en la corteza cingulada 1 (Cg1), corteza infralímbica (IL) y prelímbica (PrL), después de administraciones agudas y crónicas de D (1mg/kg) en diferentes contextos. \* $p < 0.05$  vs. S en Cg1, IL y PrL.

### DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Albrechet-Souza, Borelli, Carvalho & Brandão (2009) encontraron un efecto de ansiólisis en las entradas y permanencia en brazos abiertos al administrar midazolam (0,5 mg / kg ip) en ratas ingenuas, esto coincide con lo encontrado por nosotros en los grupos administrados de forma aguda, los mismos autores señalan además una menor expresión de c-Fos en dosis de 0,5mg/kg ip de midazolam en Cg1, IL y PrL aunque sólo fueron significativas en Cg1; por nuestra parte también las encontramos en Cg1 además de PrL. Los mismos autores encuentran además tolerancia de un ensayo a los efectos ansiolíticos del midazolam. También encontramos como Medeiros, Reis & Mello, (2005) tolerancia en la expresión de c-Fos que disminuye con administraciones repetidas de D (5mg/kg ip), en nuestro caso encontramos tolerancia con administraciones crónicas, siendo esta dependiente del contexto. Por otro lado los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con otros autores (Bozas Tritos, Phillipidis & Stylianopoulou, 1997) donde hacen una administración de D (10mg/kg ip) y se inhibe la expresión de C-Fos, inducida por inmovilización, en corteza cerebral e hipocampo en ratas.

Se concluye que la administración aguda de D tiene efectos ansiolíticos y disminuye la expresión de C-Fos en estructuras cerebrales relacionadas con la ansiedad, mientras que la administración crónica de D, produce tolerancia y aumenta la expresión de C-Fos dependiendo del contexto.

\*Albrechet-Souza L., Borelli K. G., Carvalho M. C. And Brandão M. L. (2009) The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and fos immunoreactivity. *Neuroscience*. 164: 387-397  
 \*Beck C. H. M. & Fibiger H. C. (1995). Conditioned Fear-Induced Changes in Behavior and in the Expression of the Immediate Early Gene c-Fos: With and Without Diazepam Pretreatment. *The Journal of Neuroscience*. 15(3): 709-720  
 \*Bozas E., Tritos N., Phillipidis H., & Stylianopoulou F. (1997). At least three neurotransmitter system mediated a stress-induced increase in c-fos mRNA in different rat brain areas. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 17(2): 157-169.  
 \*Larson S. J. & Siegel S. (1998). Learning and tolerance to the ataxic effect of ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61. (1): 131-142  
 \*Medeiros M. A., Reis L. C. & Mello L. E. (2005). Stress-Induced c-Fos Expression is Differentially Modulated by Dexamethasone, Diazepam and Imipramine. *Neuropsychopharmacology* 30: 1246-1256  
 \*File S. E. (1985). Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 9: 113-121.



# EFFECT OF C-FOS ACTIVATION IN ASSOCIATIVE AND PHARMACOLOGICAL TOLERANCE TO ANXIOLYTIC EFFECT OF BENZODIAZEPINES.

Silva-Higareda A. (1), González-Sánchez D. (1), Castillo-Roberto G. (1), Estrada C. (2), Cruz P. (2), Morán C. (2) and Cruz-Morales SE (1).  
(1) Psychopharmacology, UNAM FES Iztacala and (2) BUAP



## INTRODUCTION

Benzodiazepines are widely used to the treatment of anxiety, clinically, the development of pharmacological tolerance have been reported after chronic administration of benzodiazepines. Associative tolerance develops when a drug is administered in the same environment or is accompanied by the same cues. Previously we demonstrated that tolerance development to anxiolytic effect of benzodiazepines is dependent upon context of drug administration (Cruz-Morales & Cedillo, 2008). The elevated plus maze (EPM) is a sensitive procedure used to evaluate anxiety in rodents. The expression of protein Fos can be induced by a variety of physiological and pharmacological stimuli, the protein is released in response to these stimuli (Salminen, Lahtinen & Ahtee, 1996), particularly c-fos activation has been reported in different animal models (Duncan, Knapp & Brees, 1996).

## OBJECTIVE

To analyze c-Fos activation in several CNS areas and performance in the EPM after administration of midazolam in different contexts of administration.

## METHODOLOGY

Wistar male rats (200g) were randomly assigned to independent groups. The groups received acute or chronic administrations of 1 mg/kg, ip, of midazolam (M) in two different contexts. One context was the Laboratory (L) in which the Ss were evaluated in the EPM; the other context was the colony room (C), adjacent to the laboratory. All injections were administered 15 min before the exposure to the EPM; the chronic groups were evaluated in the EPM on day 21 of treatment. The percentage of number of entries and time of permanence in open arms were considered an index of anxiety.

Two hr after EPM exposure, subjects were sacrificed, perfused and the brain were extracted. Tissue sections of 50µm were obtained and the c-Fos protocol was followed. The nuclei were counted and expressed as the number of Fos-positive cells per 0.1mm<sup>2</sup>. Tissue sections were observed under a light microscope (Olympus BX41) equipped with a video camera module (Evolution VF) coupled to the computerized image analysis system (Image Pro Plus 6.3, Media Cybernetics Bethesda MD). Fos-positive neurons were visualized under bright-field microscopy, darker objects with areas between 5 and 100mm<sup>2</sup>. Areas with the same shape and size comprising representative parts of each brain region were used for all rats, and counting of Fos-positive neurons was performed under a 10x objective.

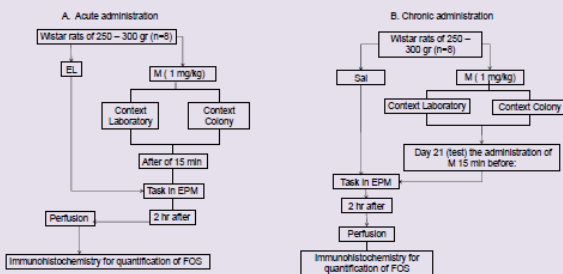


Figure 1. Methodology

## ELEVATED PLUS MAZE

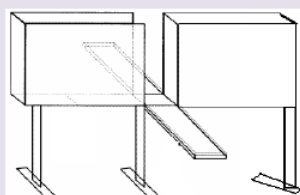


Figure 2. EPM

## RESULTS

The anxiolytic effect of acute administration of midazolam was detected in the percentage of entries and time spent in open arms in the group that received the injection in the same context of behavioral test. However, when the administration and the test were done in different context the anxiolytic effect was not detected (Figs. 3, 4).

## ACUTE ADMINISTRATION

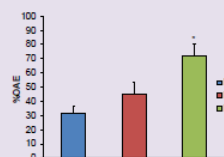


Figure 3. Mean and sSEM of %OAE after acute administration of M (1mg/kg). \*p<0.05 vs. L and M.C.

## ACUTE ADMINISTRATION

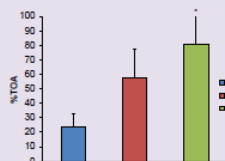


Figure 4. Mean and sSEM of %TOA after acute administration of M (1mg/kg). \*p<0.05 vs. L and M.C.

In the groups pretreated for 20 days with midazolam, tolerance was detected in the group receiving the pretreatment and the test in different contexts, but not in the group that received chronic administrations and was tested in the same context OAE (Figs. 5, 6).

## CHRONIC ADMINISTRATION

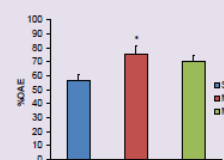


Figure 5. Mean and sSEM of %OAE after chronic administration of M (1mg/kg). \*p<0.05 vs. S and M.L.

## CHRONIC ADMINISTRATION

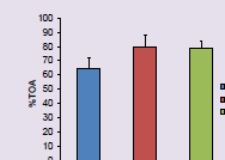


Figure 6. Mean and sSEM of %TOA after chronic administration of M (1mg/kg).

## LABORATORY

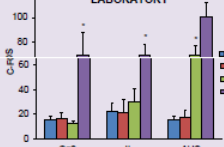


Figure 7. Mean and sSEM of o-FOS positive cells measured in the cingulate cortex (Cg1), intralimbic cortex (IL) & anterior hypothalamic central area (AHC), after acute and chronic administration of M in laboratory context (1mg/kg). \*p<0.05 vs. L and EL.

## COLONY

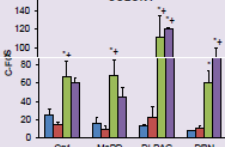
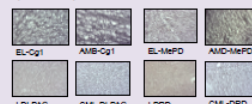
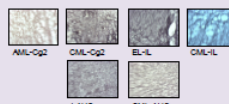


Figure 8. Mean and sSEM of o-FOS positive cells measured in the cingulate cortex (Cg1), medial postero-dorsal amygdala (MePD), dorsal lateral periaqueductal gray (DLPA) and dorsal raphe nucleus (DRN), after acute and chronic administration of M in colony context (1mg/kg). \*p<0.05 vs. L; +p<0.05 vs. EL.



## DISCUSSION AND CONCLUSION

The results show the anxiolytic effect of M after acute administration. Tolerance was detected when subjects were evaluated in the same context but not in different context of administration, confirming previous findings (Cruz-Morales & Cedillo, 2008).

The pattern of c-Fos activation showed important changes in different cerebral structures, the changes were also dependent upon days of administration (acute or chronic) and drug administration context. Taken together the results suggest that anxiety and context-specific tolerance also modify the neuronal activity in different regions of the CNS.

Despite that the activation of c-Fos increases differentially in several models of anxiety, the medial prefrontal cortex, medial amygdala, and lateral septum were specifically activated (Duncan et al 1996). On the other hand some reports describe an inhibitory effect of benzodiazepines on c-Fos activation induced by anxiety in cortex and hypothalamic areas (Medeiros, Reis & Mello, 2005). However unspecific activation of amygdala has been detected after administration of anxiogenic and anxiolytic drugs (buspirone and diazepam) with different mechanisms of action (Thompson & Rosen, 2006).

## References

Cruz-Morales SE & Cedillo B. (2008). In: Neural mechanisms of action of abuse and natural reinforcers. Research abstract, 25-40.  
 Duncan GS, Knapp DJ, & Brees GR. (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. Brain Research, 75:713-20, 70-21.  
 Medeiros MA, Reis LC, & Mello LE. (2005). Stress-induced c-Fos expression is differentially modulated by desamfetamine, diazepam and isiprine. Neuropharmacology 50, 1246-1256.  
 Salminen O, Lahtinen S, & Ahtee L. (1996). Expression of Fos protein in various rat brain areas following acute nicotine and Diazepam. Pharmacology Biochemistry and Behavior 54 (1), 249-258.  
 Thompson SL, & Rosen JB. (2006). Immediate-early gene expression in the central nucleus of the amygdala is not specific for anxiolytic or anxiogenic drugs. Neuropharmacology 51 (1), 97-108.



# EXPRESSION OF C-FOS IN CEREBRAL STRUCTURES IN RATS WITH ACUTE AND CHRONIC TREATMENT OF MIDAZOLAM. <sup>1</sup>CRUZ-MORALES SE, <sup>1</sup>GONZÁLEZ-SÁNCHEZ DJ, <sup>1</sup>CASTILLO-ROBERTO G, <sup>2</sup>ESTRADA C, <sup>2</sup>MORÁN C, <sup>1</sup>UNAM, FES-Iztacala, Psychopharmacology and <sup>2</sup>BUAP.



177.17/PP21

## INTRODUCTION

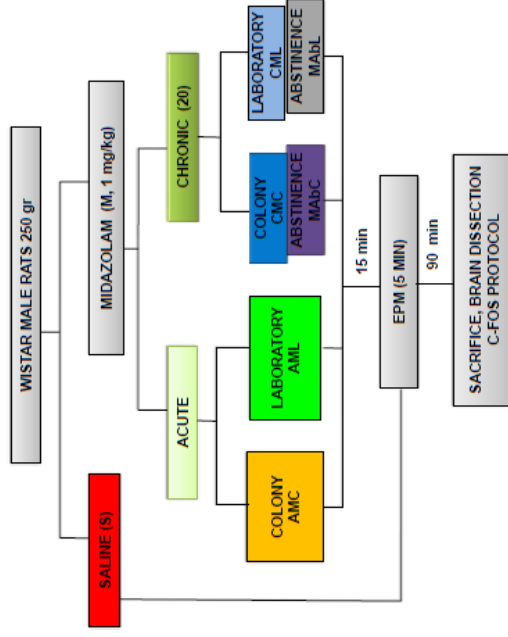
Benzodiazepines (BZ) are mainly used in the treatment of anxiety, prolonged use produce tolerance and dependence. The interruption of treatment produces "withdrawal syndrome" inducing anxiogenic effects, so it is important to know the neuronal substrates responsible for these effects. The protein expression of c-Fos allows the identification of neural activation to different stimuli; such activation is also produced by anxiogenic stimuli. Withdrawal can act as a factor of stress and could activate cerebral structures involved in the modulation of anxiety. Previously we demonstrated that tolerance development to anxiolytic effect of benzodiazepines is dependent upon context of drug administration.

## OBJECTIVE

To evaluate the effect of acute administration and withdrawal to midazolam (M) on the expression of C-Fos in various regions of the brain involved in anxiety in rats exposed to the elevated plus-maze (EPM) in different administration contexts.

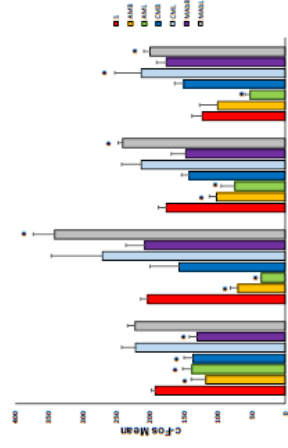
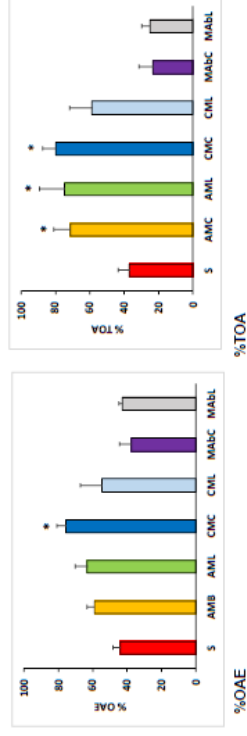
## METHODOLOGY

Wistar male rats (200 g) were randomly assigned to five independent groups and injected in two different contexts, colony room or laboratory. The groups received either acute or chronic administrations of 1 mg/kg, ip of M 15 min before the exposure to the EPM; the chronic groups were evaluated in the EPM on day 21 of treatment. The percentage of number of entries and time of permanence in open arms were considered an index of anxiety. Two hr after EPM exposure, subjects were sacrificed and the c-Fos protocol was followed.



## RESULTS

Acute administration produced an anxiolytic effect and a decrease in the expression of C-Fos; chronic administration induced tolerance CX dependent; abstinence groups differ from acute groups and showed a significant increase of the expression of C-Fos in Cg1, Cg2, infralimbic and prelimbic regions (CX dependent).



## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The decrease in c-Fos expression under acute M administration is consistent with previous reports (1), while the increase detected in withdrawal is similar to the effect reported in withdrawal in nucleus accumbens (2), however these effects are dependent of the context of administration. It is concluded that the acute administration of M has anxiolytic effects and decreases the expression of C-Fos in brain structures associated with anxiety, while in withdrawal c-Fos expression increases and these effect are context dependent.

1. Wronka-Szarek A, Zienowicz M, Lechner M, Trzcinka E, Bizoni S, A, Maciejak P, Skożarska A, Szpyrka J & Papiit A (2006). Midazolam inhibits neurophobin-induced Fos expression in the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 51: 107-115.  
 2. Duka M, Mader RW, Mader RW, Mader RW (2000). Previous experience of withdrawal from chronic diazepam ameliorates the anxioliveness of precipitated withdrawal and reduces withdrawal-induced c-fos expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 2000 Apr 12;11:1501-15.

# EXPRESIÓN DE C-FOS EN RATAS CON SÍNDROME DE ABSTINENCIA A MIDAZOLAM

González-Sánchez DJ (1), Castillo-Roberto G (1), Estrada C (2), Morán C (2), Cruz-Morales SE (1).  
(1) FES-Iztacala, UNAM, (2) BUAP.

## INTRODUCCIÓN

Las benzodiazepinas (BZ) son empleadas como sedantes, anticonvulsivantes y en el tratamiento de ansiedad, el uso prolongado de estas BZ puede producir diferentes síntomas indicando un estado de dependencia (Baptista y cols. 2007), estudios previos han encontrado que puede desarrollarse tolerancia a los efectos sedantes o ansiolíticos de BZ en animales (File, 1985). La interrupción del tratamiento produce "síndrome de abstinencia" incrementándose la ansiedad, por lo que es importante conocer los sustratos neuronales responsables de estos efectos. A través de la técnica de inmunohistoquímica puede observarse la expresión de la proteína c-Fos y con ello se identifica la activación neuronal que ocurre ante diferentes estímulos, dicha activación también es producida por estímulos ansiosgénicos como el síndrome de abstinencia ante algunas drogas (Hayward, Duman & Nestler, 1990). El síndrome de abstinencia puede actuar como un factor de estrés y podría activar un conjunto particular de estructuras implicadas con los estados de ansiedad.

## OBJETIVO

Evaluar el efecto de la administración aguda y la presencia del síndrome de abstinencia después de la administración crónica de midazolam (M), en ratas sometidas a una tarea de LEC, así como la expresión de C-Fos en diversas regiones del cerebro involucradas en la ansiedad.

## METODOLOGÍA

Ratas macho Wistar se asignaron a 5 grupos independientes: control Salina=SL, dos grupos con administración aguda de M intraperitoneal (ip), evaluados en el contexto bioterio (AMB) o contexto laboratorio (AML) y para evaluar el síndrome de abstinencia, un grupo recibió 20 administraciones de M en contexto bioterio (MABb) y otro grupo en contexto laboratorio (MABl), en el día 21 se evaluó la ejecución en LEC. Los datos fueron analizados con ANOVA y cuando hubo diferencias se realizó la prueba LSD.

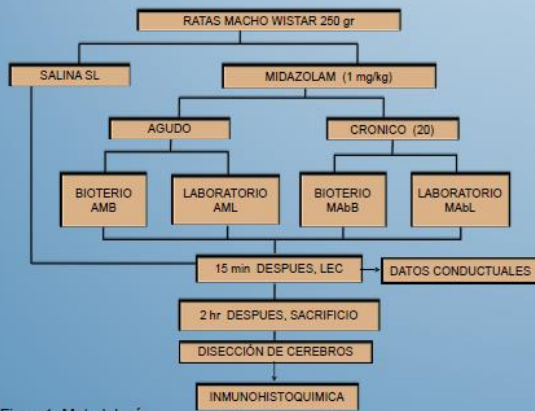


Figura 1. Metodología

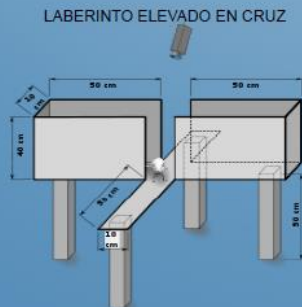


Figura 2. LEC

## RESULTADOS

La administración aguda produjo un efecto ansiolítico, pues en la prueba del LEC los sujetos con tratamiento agudo mostraron mayor actividad en los brazos abiertos, siendo el tiempo de permanencia la medida más sensible.

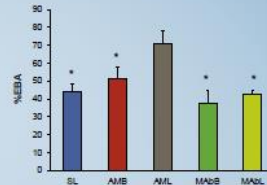


Figura 3. Media y  $\pm$ SEM de %EBA después de administraciones agudas y crónicas de M (1mg/kg). \*p<0.05 vs. AML.

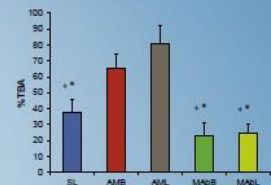


Figura 4. Media y  $\pm$ SEM de %TBA después de administraciones agudas y crónicas de M (1mg/kg). \*p<0.05 vs. AMB. +p<0.05 vs. AML.

En las medidas de c-Fos se encontró que el síndrome de abstinencia provocó mayor presencia de células fos activadas en el grupo de MABl en relación al grupo control y los dos grupos tratados con administraciones agudas. En cuanto al otro grupo de abstinencia (MABb), se vieron niveles bajos de células fos activadas.

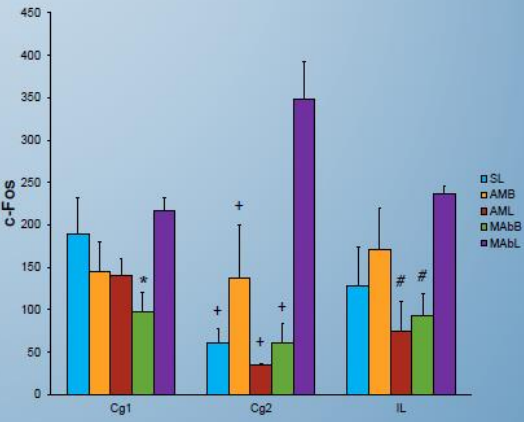


Figura 7. Media y  $\pm$ SEM de expresión de c-Fos medidas en el cortex angulado 1 (Cg1), cortex angulado 2 (Cg2) y cortex infralímbico (IL), después de administraciones agudas y crónicas de M (1mg/kg) en diferentes contextos. \*p<0.05 vs. MABl en Cg1. +p<0.05 vs. MABl en Cg2. #p<0.05 vs. MABl en IL.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Se concluye que la administración aguda de M tiene efectos ansiolíticos porque los sujetos sometidos a este tipo de tratamiento presentaron mayor actividad en los brazos abiertos, lo cual normalmente les resulta aversivo y les provoca ansiedad, lo cual coincide con lo que mencionan Baptista, y cols. (2007) sobre el efecto ansiolítico de las BZ; además otra prueba de ello es que la expresión de c-Fos se vio disminuida en estructuras cerebrales relacionadas con la ansiedad. Por otra parte, en la presencia del síndrome de abstinencia se manifiesta un incremento de la expresión del gen c-Fos y en esto encontramos relación con Hayward, Duman & Nestler (1990) que menciona al síndrome de abstinencia como factor ansiosgénico reflejado en la expresión de c-Fos. Dicha expresión se encuentra relacionada con el desarrollo de la tolerancia; en el caso de este estudio se observó que el grupo que fue sometido a administración crónica y probado en el LEC (el día de la prueba sin administración de fármaco) en el mismo contexto en el cual había recibido la administración crónica presentó mayor expresión de c-Fos que el que recibió la administración crónica en un contexto diferente del de la prueba.

Resulta necesario considerar el desarrollo de tolerancia a las BZ, mencionado por File (1985), porque lo encontrado en este trabajo indica que la presencia del síndrome de abstinencia puede estar fuertemente relacionada con el tipo de tolerancia asociada al contexto, es decir, puede ser específico de los estímulos discriminativos, pues al encontrarse en el contexto habitual de administración los sujetos presentaron mayor nivel de síndrome de abstinencia.

## Referencias

- Baptista F. L., Ferreira R., Cabral A., Moreno C. V., Lira B. M. & Nobre M. J. (2007) Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Research*, 1165, 35-46.
- File, S. E. (1985). Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9, 113-121.
- Hayward M. D., Duman R. S. & Nestler E. J. (1990). Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Research*, 525, 256-266.