



Universidad
Nacional
de Córdoba



Departamento de
FARMACOLOGÍA
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

CONICET



I F E C

***PROCESOS DE PLASTICIDAD NEURONAL
MEDIADOS POR ÓXIDO NÍTRICO EN LA
DEPENDENCIA A BENZODIACEPINAS***

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

Farmacéutica Emilce Artur de la Villarmois

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
IFEC-CONICET
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
ARGENTINA**

~2019~

DIRECTORA DE TESIS

- **Dra. Mariela F. Pérez.**

COMISIÓN EVALUADORA

COMISIÓN ASESORA:

- **Dra. Irene D. Martijena**
- **Dra. Valeria P. Carlini**
- **Dr. Fabio M. Cerbán**

EVALUADORA EXTERNA:

- **Dra. Analía G. Reinés**

“Cualquier momento es perfecto para aprender algo nuevo”.

Albert Einstein

A mis padres, Alberto y Lucía

AGRADECIMIENTOS

*Al **Departamento de Farmacología**, por brindarme el espacio y el equipamiento y los medios para el desarrollo de esta tesis.*

*A la Secretaria de Ciencia y Tecnología (**SECyT**) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (**CONICET**), por otorgarme el apoyo económico para la realización de esta tesis.*

*A los miembros de mi comisión asesora de tesis, **Dra. Valeria P. Carlini**, **Dra. Irene D. Martijena** y **Dr. Fabio M. Cerbán**, por el respeto y el excelente trato que siempre tuvieron para conmigo, por acompañarme desde la primera charla de tesis con sus valiosos aportes y sugerencias, favoreciendo mi aprendizaje durante estos años, y por la paciencia y las valiosas correcciones durante la escritura del manuscrito de tesis.*

*A la **Dra. Analía G. Reinés**, por aceptar ser miembro de la comisión evaluadora como evaluadora externa, y dedicarle tiempo a la revisión y evaluación de esta tesis.*

*A mi directora de tesis, **Mariela**, por creer en mí desde el primer momento en que llegue a FÁRMACO, por guiarme y ayudarme a crecer en mi formación profesional y contribuir en mi aprendizaje día a día. Por la confianza y la libertad que me diste en el desarrollo de experimentos, por enseñarme y sentarte al lado mío en la mesada cuando lo necesité. Por reconocer el esfuerzo y el trabajo de todos los días. Por tu calidez humana, tus consejos y palabras de aliento en el ámbito personal, por tu trato respetuoso, y por el voto de confianza y tu preocupación en mi carrera científica... GRACIAS...*

*A los **profesores de FÁRMACO**, por su respeto y cordialidad para conmigo. A **Gastón**, por sus palabras de aliento desde que empecé el doctorado, por siempre estar dispuesto a ayudarme, y por su tiempo, dedicación y comentarios en los experimentos de plasticidad estructural de esta tesis, como de otras colaboraciones que realizamos.*

*Al **Dr. Xiu-Ti Hu**, por su gran ayuda para poder realizar los experimentos de Patch-clamp presentados en esta tesis... Thank you very much!*

A **Estela y Lorena**, por su ayuda y buena predisposición siempre para todo, por estar pendientes e involucrarse en los experimentos y por las charlas, risas y consejos durante largas jornadas, su calidez humana hace que el día a día sea más alegre.

A **Leo**, para mi “copito”, por su enorme ayuda y buena predisposición en los experimentos, sobre todo en los de Patch-Clamp que sin su ayuda hubiera sido mucho más difícil poder terminarlos. Por tu alegría contagiosa de todas las mañanas y los chocolates que siempre llegaban en el momento perfecto. Gracias por estar siempre pendiente de mí, de mi bienestar y de mis experimentos, siempre dispuesto a dar una mano.

A **Silvita**, nuestra secre, por su ayuda con los asuntos administrativos y buena predisposición para solucionar cualquier problema.

A **María José**, por su ayuda y buena predisposición para realizar todos los trámites, por estar siempre dispuesta para las organizaciones “varias” del departamento. Y por su buena energía de siempre, gracias por estar siempre dispuesta a escuchar y dar un buen consejo.

A **Yani, Nico y Javi**, por su asistencia en cuestiones relacionadas al bioterio, por aguantar a la “pesadilla” cuando les pedía la planilla de la quincena antes de tiempo, por el excelente trato que tuvieron siempre conmigo.

A **Lauri Gabach**, mi hermana científica, por acompañarme tanto los primeros años y estar al lado mío todo el tiempo enseñándome, por preocuparte en mis experimentos, por pensar en mi bienestar, por las charlas y risas durante largos días de LTP. Gracias por ser tan cariñosa conmigo y buena persona. Tu presencia y apoyo fueron muy importantes para mí.

A la “niña” **Ivana y Pato**, por rescatarme en medio del caos de los experimentos de western, por sus consejos y su alegría de todos los días.

A **Nati**, nataliaaaaa, por ser mi salvavidas, eternamente agradecida por todo lo que hiciste por mí, por tus sabias palabras y consejos, por tu amistad y compañerismo de todos los días, por estar siempre.

A **Marisa**, mi hermana científica, por ser una personita tan linda por fuera y por dentro, porque tus abrazos y tu presencia son capaces de arreglar todo, gracias por las charlas y mates “after lab”, por las risas sanadoras, por los

consejos, por la complicidad. Por tu ayuda en los experimentos, y por las salvadas del LTP.

A **Agustín**, nuestro Neurocirujano estrella, gracias por preocuparte siempre en ayudarme y en darme una mano en el laboratorio, por las charlas, risas y consejos, por nuestras tardes de meriendas y alguna que otra cervecita de por medio.

A mis compañeros de laboratorio, **Vicky** “copito”, **Romi** “shomina”, **Maca** “chaina”, **Pablo** “pablooooo”, **Ceci P** “diosor”, **Andre** “penguin”, **Leo** “copito”, **Tincho** “ Dr. Osvaldo”, **Pauli Avalos**, **Andre** “suguz”, **Pau Albrecht**, **Guadita**, **Dai** “shubia”, **Lucecita**, **Flor**, **Sami**, **Lucía**, **Ramiro**, **Lean**, **Juli**, **Joha**, **Marianela** “adela”, **Agustín**; esas personas con las que uno comparte el día a día, por la complicidad, los buenos momentos y las alegrías, por el apoyo y la buena onda cuando los experimentos no salen, por los mates compartidos y la compañía los fines de semana. Y especialmente gracias a “**las bolitas**” ese grupo que hasta el apodo es gracioso, que se formo lleno de complicidad y de alegría, gracias por estar siempre dispuestos a darme una mano, por las palabras de aliento, por la buena energía y las risas que nunca faltaron durante los días que se hacen de noche en el laboratorio. Gracias por alegrarse de mis logros, y tenerme paciencia cuando los días no eran los mejores, por los abrazos y las risas sanadoras, y por los “after lab” tan necesarios.

A mis Amigachas Farmacéuticas, **Lina**, **Agus**, **May** y **Viki**, esas amigas que se transformaron en familia durante la licenciatura, y a pesar de que la vida nos llevo a distintas partes del país, la amistad sigue intacta. Gracias por su amistad y su apoyo incondicional, por estar siempre presentes, saber que puedo contar con ustedes siempre es impagable.

A mis Doc’s Farmacéuticas, **Lina** y **Flor**, por su amistad y sus consejos, por entenderme y hacerme el aguante, por las charlas y las catarsis con helado de por medio “siempre”

A **Leila** “limón”, por tu amistad incondicional, gracias por las charlas, salidas, risas, complicidad y viajes. Por estar siempre en las buenas y en las malas, por ser esa persona con la que puedo contar para todo, que siempre

está dispuesta a salir corriendo para ayudarme, gracias por tu amistad que vale oro.

*A mis amigas de salta, **Coni, Vachi, Mili y Mary**, por tantos años de amistad, por preocuparse siempre en mi, y mantener el contacto a pesar de la distancia, por las horas eternas de charlas y risas, por la complicidad de la amistad, por estar siempre para darme un consejo y apoyarme en todas mis decisiones, gracias por ser incondicionales.*

Por último y no por ello menos importante, eternamente agradecida a mi familia, que son lo más importante que tengo en mi vida;

*A mis padres **Lucía y Alberto**, por ser todo, mis pilares, por el apoyo incondicional en todas mis decisiones gracias porque siempre puedo contar con ustedes, por estar siempre presentes, por enseñarme a ser perseverante y seguir adelante, a trabajar por lo que uno quiere, por enseñarme lo que es el respeto, y lo importante de hacerme respetar. Por compartir mi felicidad y no dejarme caer en los malos momentos. Por su confianza ciega y apostar siempre en mí.*

*A mi hermano, **Adrián**, por apoyarme siempre, por su interés y alegrarse de mis logros, por cuidarme y estar siempre que lo necesité.*

*A mi hermano, **Matías**, por estar pendiente de mi y de lo que necesito, por estar presente y saber que puedo contar con vos siempre.*

*A mi hermana, **Elizabeth**, por ser mi mejor amiga, por estar siempre pendiente y enseñarme a ver las cosas importantes, por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme de libertad, de confianza y de perseverancia. Por estar tan cerca estando tan lejos.*

*A **Nicolás**, por acompañarme los fines de semana al laboratorio y por ir a buscarme a las 11 de la noche después de largos experimentos. Por escucharme y aconsejarme siempre, por apoyarme en todas mis decisiones. Pero sobre todo por tu cariño, tu amor, tu respeto y tu compañía que hacen que los días malos sean más lindos y que los días lindos sean más felices!!*

A todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron o participaron en la realización de esta tesis, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET), de acuerdo a la reglamentación vigente para optar por el grado de Doctora en Ciencias Químicas.

Para la realización de este trabajo la autora contó con una beca de la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC) 2015-2017, y una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) 2018-2019. Además, se contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por CONICET 2013-2015, SECyT 2014-2016, SECyT 2016-2017 y por el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) 2019-2022.

Se deja constancia que se ha cumplimentado con los cursos requeridos, así como también se realizaron actividades docentes en asignaturas del Departamento de Farmacología de esta Facultad.

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	12
BENZODIACEPINAS	13
Mecanismo de Acción	14
Farmacoquímica	15
Farmacocinética	15
Efectos Farmacológicos	16
Efectos adversos	16
ABUSO Y MAL USO DE LAS BENZODIACEPINAS	20
CONDICIONAMIENTO PAVLOVIANO	22
EL HIPOCAMPO	23
Estructura anatómica del hipocampo	24
Plasticidad sináptica: Potenciación a Largo Plazo	25
Mecanismos moleculares que participan en la generación de la Potenciación a Largo Plazo	26
CIRCUITO DE RECOMPENSA	27
Modulación funcional entre el hipocampo y el núcleo accumbens ..	27
EL ÓXIDO NÍTRICO	30
El óxido nítrico en el sistema nervioso central	32
Funciones del óxido nítrico	32
MARCO TEÓRICO PARA EL DESARROLLO DE LA HIPÓTESIS	33
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
MÉTODOS GENERALES	38
Sujetos experimentales:	39
Drogas utilizadas en animales:	40
Estadística:	40
OBJETIVO I	41

ANTECEDENTES	42
MÉTODOS	43
Protocolos de administración:.....	43
Laberinto en cruz elevado:	45
Test de campo abierto:	46
RESULTADOS:.....	46
CONCLUSIONES PARCIALES:	52
OBJETIVO II	54
ANTECEDENTES	55
MÉTODOS	56
Electrofisiología	56
RESULTADOS.....	58
CONCLUSIONES PARCIALES	60
OBJETIVO III	61
ANTECEDENTES	62
MÉTODOS	62
Procedimiento de Western Blot:	63
RESULTADOS.....	63
CONCLUSIONES PARCIALES	66
OBJETIVO IV	67
ANTECEDENTES	68
MÉTODOS	68
Protocolo con 7-NI:.....	68
Electrofisiología:	69
RESULTADOS:.....	69
CONCLUSIONES PARCIALES	71
OBJETIVO V	73
ANTECEDENTES	74
MÉTODOS	75
Preparación del tejido:.....	75
Electrofisiología (Patch-clamp):	75
Análisis de plasticidad estructural:.....	77
Procedimiento de Western Blot:	79

Determinación de nitritos y nitratos:	79
RESULTADOS.....	80
CONCLUSIONES PARCIALES	87
DISCUSIÓN GENERAL	90
CONCLUSIONES FINALES	96
BIBLIOGRAFÍA	99
PUBLICACIONES	117
Colaboraciones:	121

ABREVIATURAS:

%TA: porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos

7-NI: 7-Nitroindazole

AHP:- del inglés- after hyperpolarization period

AM: amígdala

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol

AMPc: adenosin monofosfato cíclico

ANOVA: análisis de varianza

Arc: - del inglés- Activity Regulated Cytoskeleton- associated protein

BA: brazos abiertos

BC: brazos cerrados

BZDs: benzodiazepinas

CA: cuerno de amonias

CaMKII: Ca²⁺/calmodulinkinasa

DA: dopamina

DO: densidad óptica

DZ: diazepam

DZ-D: diazepam- dependiente

DZ-ND: diazepam- no dependiente

EC: estímulo condicionado

EI: estímulo incondicionado

EPSP: -del inglés- Excitatory Post SynapticPotentials

GABA: ácido γ - amino- butírico

GCs: guanilatociclasa

GD: giro dentado

GMPc: guanosinmonofosfato cíclico

HP: hipocampo

HPd: hipocampo dorsal

HPv: hipocampo ventral

i.p: intraperitoneal

IL: inhibición latente

IN: interneurona

LC: locus coeruleus

LCE: laberinto en cruz elevado

LCRa: líquido cefalorraquídeo artificial

LTP: - del inglés- Long Term Potentiation: Potenciación a Largo Plazo

mOsm: mili osmol

MSN: -del inglés- Medium Spiny Neurons

mV: milivoltios

NAc: núcleo accumbens

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico

NOS: óxido nítrico sintasa

NP: neurona piramidal

ON: óxido nítrico

PA: potencial de acción

PBS: buffer salino fosfato

PKMz: proteína-quinasa M zeta

PSD95: proteína de densidad postsináptica

RC: respuesta condicionada

RF: formación reticular

RI: respuesta incondicionada

Rin: - del inglés- input resistance

RMP:-del inglés- resting membrane potential

RN: núcleo del rafe

RTN: núcleo reticular

SEM: -del inglés- standard mean error: media del error estándar

SN: sustancia nigra

SNC: sistema nervioso central

VB: núcleo ventrobasal

VEH: vehículo

VTA: área tegmental ventral

RESUMEN

RESUMEN:

Las benzodiazepinas (BZDs) son uno de los medicamentos más prescritos para los trastornos de ansiedad y sueño, cuyo tratamiento requiere de la administración crónica del medicamento, pudiendo generar dependencia. En este caso, la interrupción de su administración conduce a la aparición del síndrome de abstinencia, siendo la ansiedad el signo más predominante. El desarrollo de dependencia a diazepam (DZ, una BZDs) se asocia a un proceso de aprendizaje asociativo dependiente del contexto y se acompaña con un aumento de la plasticidad sináptica en el hipocampo (HP). El HP es una estructura cerebral que participa en procesos de aprendizaje y memoria, y en la iniciación y mantenimiento de la adicción a sustancias adictivas. Además el HP envía y recibe proyecciones del núcleo accumbens (NAc), una de las principales estructuras cerebrales implicada en la neurobiología de la adicción, de esta forma estas dos estructuras se regulan funcionalmente de forma bi-direccional. El óxido nítrico (ON), sintetizado principalmente por la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (NOS-1), es un neurotransmisor gaseoso que cumple un rol fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria, en la transmisión sináptica en el HP y en la regulación de la actividad de las células principales del NAc. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este estudio investigamos si la interferencia del proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia, mediante el empleo de un protocolo de inhibición latente (IL), es capaz de prevenir el incremento del índice de ansiedad en ratas Wistar macho durante la abstinencia a DZ, y el aumento de la transmisión sináptica en el HP, a través de un mecanismo mediado por ON. Además como segundo objetivo, nos propusimos caracterizar los cambios en la plasticidad funcional y estructural de las células principales del NAc, y en la neurotransmisión nitrérgica en esta estructura, durante la abstinencia a DZ.

Nuestros resultados indican que los animales que recibieron DZ de manera crónica utilizando el protocolo de IL no mostraron un comportamiento del “tipo ansioso” durante la abstinencia, ni cambios en la transmisión sináptica

en el HP, pero se observó una reducción significativa en la expresión de NOS-1. Además, la inhibición farmacológica de NOS-1 generó cambios conductuales y electrofisiológicos similares a los inducidos por la IL. Por el contrario, los animales que recibieron DZ con el protocolo Control expresaron un comportamiento del “tipo ansioso” y evidenciaron un aumento en la plasticidad en el HP, sin alteraciones en la expresión de NOS-1 durante la abstinencia. En conclusión, la manipulación de las claves contextuales presentadas durante la administración crónica a DZ podría considerarse como una herramienta no farmacológica eficaz para prevenir la manifestación de la abstinencia. Esta estrategia cognitiva puede influir en la transmisión sináptica del HP, probablemente por alteraciones en las vías de señalización del ON en esta estructura.

Por otro lado nuestros resultados mostraron que la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia, luego de la administración crónica de DZ, se acompañó con una reducción en la plasticidad funcional y estructural en las células principales del NAc, y en la expresión y actividad de la enzima NOS-1. Entonces, considerando que el ON es un actor importante en la modulación de la actividad y arborización dendrítica de las células principales del NAc, la disminución de la disponibilidad del ON en esta estructura durante la abstinencia a DZ podría explicar en parte estos resultados. Además teniendo en cuenta que el NAc envía proyecciones inhibitorias al HP y a su vez recibe aferencias excitatorias de esta estructura, nuestros resultados indicarían que el aumento de la transmisión sináptica en el HP podría potenciar la neurotransmisión de interneuronas inhibitorias en el NAc, produciendo una disminución de la excitabilidad de sus células principales. De la misma manera, la inhibición de la actividad del NAc contribuiría con el aumento en la plasticidad sináptica hipocampal. La neurotransmisión nitrérgica parecería tener un rol preponderante en los cambios observados en ambas estructuras. Sin embargo, la complejidad del circuito involucrado en la dependencia a DZ y las conexiones directas e indirectas entre las estructuras del SNC no nos permiten establecer una relación directa entre la funcionalidad de ambas estructuras, ni descartar la participación de otras áreas involucradas en este fenómeno.

ABSTRACT

ABSTRACT:

Benzodiazepines (BZDs) are usually prescribed for anxiety and sleep disorders in long term schedules that may cause drug dependence. Discontinuation after prolonged administration may lead to withdrawal expression, being anxiety the most predominant sign. The development of dependence to diazepam (DZ, a BZDs) is considered as a context-dependent associative learning process and is accompanied by an increase in hippocampus (HP) synaptic plasticity. HP is a brain structure that participates in learning and memory processes, and in the initiation and maintenance of drug addiction. Furthermore, the HP sends and receives projections to nucleus accumbens (NAc), one of the main brain structures involved in the neurobiology of addiction, and their function is regulated bi-directionally. Nitric oxide (NO), synthesized primarily by the neuronal nitric oxide synthase enzyme (NOS-1), is a gaseous neurotransmitter that plays a fundamental role in learning and memory processes, in HP synaptic transmission as well as in NAc neuronal activity regulation. Considering this background, in this study we investigate whether the interference of the associative learning process that underlie the development of dependence, by using a latent inhibition protocol (LI), is able to prevent the enhancement of the anxiety index in male Wistar rats during DZ withdrawal and the enhanced HP synaptic transmission, through a NO-mediated mechanism. In addition, we further characterize possible changes in functional and structural plasticity in the NAc principal cells, and nitrenergic neurotransmission in this structure, during DZ withdrawal.

Our results indicate that chronic DZ treated animals under LI protocol did not show an anxiety-like behavior, or changes in HP synaptic transmission, but a significant reduction in NOS-1 expression was observed. Accordingly, pharmacological NOS-1 inhibition resembles behavioral and electrophysiological changes induced by LI. Contrary, DZ treated animals under Control Protocol expressed an anxiety-like behavior and evidenced an increased HP plasticity, without alterations in NOS-1 expression. In conclusion, manipulation of the contextual cues presented during DZ administration may be considered as an effective non-pharmacological tool to prevent the withdrawal

syndrome. This behavioral strategy may influence HP synaptic transmission, probably by alterations in NO signaling pathways in this structure.

On the other hand, our results showed that the anxiety-like behavior expression during withdrawal syndrome, after DZ chronic administration, was accompanied by a reduction in functional and structural plasticity within NAc, and in the NOS-1 expression and activity. Considering that NO is a crucial player in NAc principal cells excitability and in dendritic branching, the decreased availability of NO in this structure during DZ withdrawal could explain these results. In addition, considering that NAc sends inhibitory projections to the HP and in turn receives excitatory afferents from this structure, our results may indicate that the increased synaptic transmission in HP could enhance the inhibitory interneurons activity in NAc, producing a decrease in their principal cells excitability. Also, it is possible that inhibition of NAc activity could contribute to the HP synaptic plasticity enhancement. Nitroergic neurotransmission seems to have a preponderant role in the observed changes in both brain structures. However, the complexity of the circuit involved in DZ dependence and, direct and indirect connections between the SNC structures do not allow us to establish a direct relationship between their functionality, neither rule out the participation of other areas involved in this phenomenon.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN:

El abuso a diversas sustancias adictivas y el consiguiente fenómeno de la adicción son dos de los problemas sociales más serios y de mayor impacto en la salud pública. En las últimas décadas se ha realizado un progreso en la comprensión de los efectos de las drogas de abuso en el cerebro, sin embargo no se han podido desarrollar tratamientos efectivos para prevenir la recaída al consumo. El uso recreacional o terapéutico de diferentes principios farmacológicamente activos puede transformarse en un comportamiento adictivo. Actualmente se propone que el desarrollo de adicción es un proceso patológico de aprendizaje, que involucra la activación de vías de señalización intracelulares y cambios adaptativos a nivel de la plasticidad neuronal similares a los que ocurren durante el aprendizaje y la formación de memorias.

BENZODIACEPINAS:

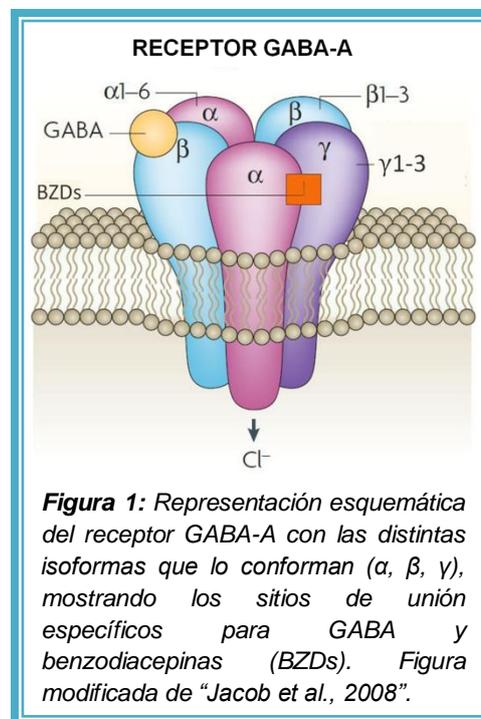
Después de más de 50 años de experiencia clínica con las benzodiazepinas (BZDs), el sistema de salud tiene una relación controversial con estos fármacos. En 1955, el químico del laboratorio farmacéutico Hoffmann-La Roche *Leo Sternbach* identificó por casualidad la primera BZDs, el clordiazepóxido. En 1960, dicho laboratorio lo comercializó como Librium, y buscó modificaciones moleculares para mejorar su actividad. El diazepam (Valium) siguió en 1963, y sus competidores también comenzaron a buscar análogos. Inicialmente, las BZDs parecían ser más seguras y menos propensas a causar dependencia que los principios farmacológicamente activos más antiguos con los mismos usos clínicos, los barbitúricos. Una mejora específica fue su falta de depresión respiratoria, el cual era un problema de seguridad con los barbitúricos. Los profesionales médicos adoptaron rápidamente el uso de las BZDs, disparando su popularidad y la demanda por parte de los pacientes. A mediados y finales de la década de 1970, las BZDs encabezaron las listas de "prescripciones más frecuentes" y diez años más tarde, el entusiasmo y la preferencia de los médicos por recetarlas crearon una nueva preocupación: el espectro del abuso y la dependencia. Los prescriptores estaban desilusionados y la opinión del público en general estaba dividida, algunos adoptaron estos

medicamentos por su capacidad de proporcionar alivio para el dolor de espalda y convulsiones, mientras que otros creían que muchos “adictos” eran víctimas inocentes cuya legítima necesidad se convirtió en una pesadilla de deseo e incapacidad para dejar de tomar el medicamento. Así comenzó el episodio más grande y largo del uso indebido de medicamentos recetados en la historia, donde los consumidores los utilizaron de manera recreativa (Wick, 2013).

Mecanismo de Acción:

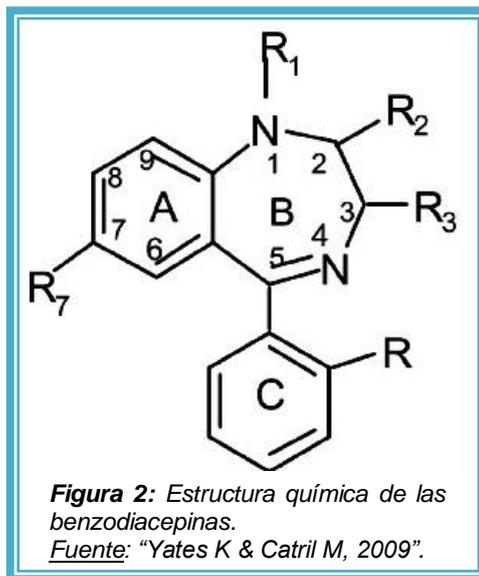
Las BZDs potencian la neurotransmisión inhibitoria mediada por el ácido γ -amino-butírico (GABA). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (SNC) y actúa sobre tres tipos de receptores hasta ahora conocidos: GABA-A, GABA-B y GABA-C. Las BDZs son moduladores alostéricos positivos de los receptores GABA-A, lo que significa que solo actúan en presencia del ligando endógeno GABA (Tan *et al.*, 2011). Cuando estos fármacos se unen a su sitio específico en el receptor, aumentan la afinidad del GABA por su sitio en este complejo, y producen un aumento en la frecuencia de apertura del canal, incrementando el influjo de Cl^- (Figura1).

El receptor GABA-A es un receptor ionotrópico, conformado por 5 subunidades proteicas, siendo la estequiometría específica de: 2α , 2β y 1γ , la conformación más abundante en el SNC. Este receptor tiene un sitio de unión específico para las BZDs ubicado en las subunidades α , pero es necesaria la subunidad γ para que tengan efecto modulador sobre la apertura del canal. Cada familia de subunidades exhibe varias isoformas: $\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, por lo tanto en el cerebro se expresan una multitud de combinaciones que dan lugar a los receptores GABA-A. Solo los receptores GABA-A que contienen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$ son sensibles a las BDZs (Wieland *et al.*, 1992).



Farmacología:

“Químicamente las BZDs están constituidas por un núcleo común que es el “anillo benzodiazepínico” (Figura 2). La mayoría posee los N del anillo benzodiazepínico en posición 1 y 4, pero algunas los tienen en posición 1 y 5. Las diversas sustituciones en las posiciones disponibles, dan origen a las distintas BZDs y su amplio espectro de efectos farmacológicos, a la potencia farmacológica con que ejercen un efecto



determinado y a las propiedades farmacocinéticas, que influyen de manera decisiva en la biodistribución y en la duración del efecto” (Hurlé *et al.*, 2008).

Farmacocinética:

“Todas las BZDs presentan buena absorción por vía oral, aunque algunas lo hacen más rápidamente que otras dependiendo del grado de liposolubilidad. El equilibrio de concentraciones entre el plasma y el cerebro se alcanza rápidamente, ya que todas son lo suficientemente liposolubles y atraviesan la barrera hematoencefálica. Son metabolizadas en el hígado por acción de enzimas del citocromo P450, muchos de los metabolitos son farmacológicamente activos (principalmente N-desmetildiazepam y nordiazepam) y tienen una vida media prolongada en humanos (36-39 horas)” (Hurlé *et al.*, 2008).

Según el tiempo de vida media en humanos, se clasifican como de acción corta, intermedia o larga. Aunque solo existen diferencias farmacodinámicas sutiles, se prefieren las BDZs de acción corta para el tratamiento del insomnio, mientras que las BDZs de acción más prolongada se recomiendan para el tratamiento de la ansiedad (Lalive *et al.*, 2011), como por ejemplo el diazepam (DZ), cuya actividad ansiolítica será creciente hasta que se alcance el nivel plasmático máximo estable tras varios días de administración. Tanto para el tratamiento del insomnio como de la ansiedad es

recomendable no prolongar el tratamiento más allá de 4 semanas (Hurlé *et al.*, 2008).

Efectos Farmacológicos:

Los principales efectos farmacológicos de las BZDs son: sedante, hipnótico, miorrelajante, ansiolítico y anticonvulsivante. También son capaces de producir amnesia anterógrada, generalmente considerado un efecto adverso de las BZDs, sin embargo, hay casos en los que esta propiedad puede utilizarse con fines beneficiosos, como por ejemplo durante los procedimientos quirúrgicos para reducir el trauma psicológico (Koht & Moss, 1997).

Los efectos farmacológicos entre las distintas BZDs disponibles son similares, y se encuentran asociados a la selectividad que presentan para los distintos tipos de subunidades α del receptor GABA-A. Estudios farmacológicos y conductuales en ratones knock-in permitieron correlacionar las isoformas de las subunidades α con los principales efectos de las BDZs. Los receptores GABA-A que contienen la subunidad $\alpha 1$ median el efecto sedante, amnésico anterógrado y anticonvulsivante (Rudolph *et al.*, 1999; McKernan *et al.*, 2000). Aquellos que contienen la isoforma $\alpha 2$ participan en las acciones ansiolíticas y en gran medida en los efectos miorrelajantes. Los receptores GABA-A que contienen las isoformas de la subunidad $\alpha 3$ o $\alpha 5$ también contribuyen a las acciones miorrelajantes de las BDZs (Crestani *et al.*, 2001; Crestani *et al.*, 2002), mientras que se demostró que los receptores GABA-A que contienen la isoforma $\alpha 5$ participan en procesos cognitivos afectados por las BDZs (Collinson *et al.*, 2002; Crestani *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2006). En cuanto a las propiedades adictivas de las BDZs, se demostró que se requiere la presencia de receptores GABA-A que contienen la subunidad $\alpha 1$ (Crestani *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2010). Además, al mejorar la actividad inhibitoria de GABA, las BZDs en una administración aguda reducen la liberación de los neurotransmisores excitadores, que incluyen noradrenalina, serotonina, dopamina y acetilcolina de manera central (Guerrini & Ciciani, 2013).

Efectos adversos:

Los efectos adversos más frecuentes se deben al desajuste de la dosis en relación con el efecto farmacológico deseado. Aparecen sedación,

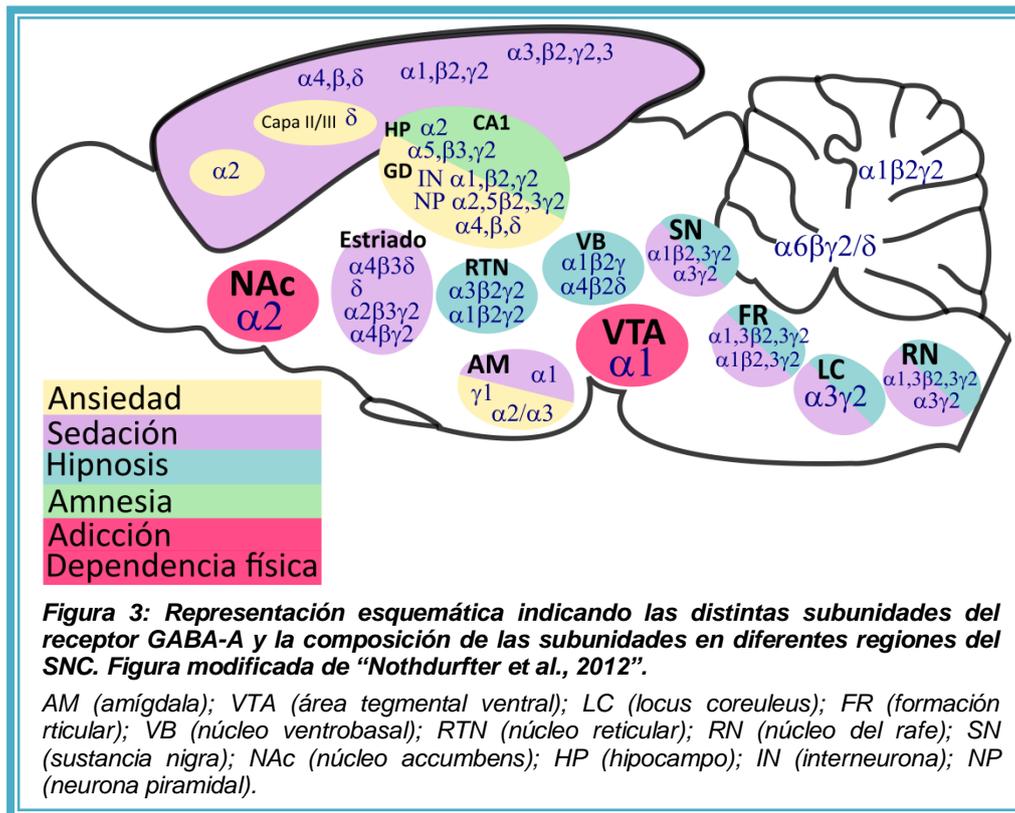
somnolencia, ataxia, confusión, trastornos de la coordinación motora, con un notable deterioro de las habilidades manuales, tales como la conducción de vehículos. Pueden producir amnesia anterógrada, es decir, limitada a hechos que suceden después de la administración. En ocasiones producen conducta agresiva u hostil, por desinhibición, o un estado inicial de nerviosismo antes de que se establezca el efecto ansiolítico o sedante. Por vía intravenosa rápida producen sueño prolongado, pero sin depresión grave de las funciones respiratorias y cardiovasculares. Sin embargo, cuando se asocian a otros depresores del SNC como el alcohol, anestésicos u opiáceos, pueden provocar una grave depresión respiratoria que llega incluso a ser mortal (Hurlé *et al.*, 2008; Rang *et al.*, 2008).

En la mayoría de los tratamientos para los cuales se prescriben las BZDs se requiere de su uso crónico. El principal problema de la administración prolongada de estos medicamentos es el desarrollo de tolerancia, dependencia y una posible evolución hacia un comportamiento adictivo. La **tolerancia** (aumento gradual de la dosis necesaria para producir el efecto deseado) es común a todas las BZDs (Rang *et al.*, 2008). Se produce tolerancia a los efectos sedantes y anticonvulsivantes, lo que se aprecia mejor cuando se administran dosis altas durante un tiempo prolongado (Hurlé *et al.*, 2008). Algunos estudios han propuesto que el desarrollo de tolerancia se debería a una modificación covalente, como una fosforilación en el receptor GABA-A lo cual disminuiría la afinidad del GABA y de las BZDs por sus sitios de unión (De Blas, 1996). Otras evidencias involucran la sensibilización en mecanismos excitatorios, generando una respuesta compensatoria en el organismo (Stephens, 1995). La **dependencia** es un trastorno que se caracteriza por la disminución en el control sobre el consumo de una sustancia. Los esfuerzos que se realizan por reducir o eliminar la administración de esa sustancia fracasan reiteradamente, por lo que en circunstancias precisas se percibe como una necesidad o compulsión hacia su administración, que origina conductas de búsqueda del principio activo. El diagnóstico en toda dependencia no es que el consumo sea elevado, sino la percepción de fallo en el control intencionado del consumo (Ayesta *et al.*, 2008). La dependencia se pone en manifiesto por la aparición de síntomas característicos del síndrome

de abstinencia, que es la expresión de los mecanismos de adaptación del organismo una vez que la sustancia ha desaparecido del mismo.

Las BZDs pueden provocar **dependencia**, incluso a dosis bajas, con un **síndrome de abstinencia** que se instaura lentamente tras la supresión del fármaco. Entre los síntomas más comunes del síndrome de abstinencia a BZDs se encuentran la ansiedad, insomnio, despersonalización y alteraciones sensoriales, acompañados de una sintomatología somática: palpitaciones, hiperventilación, intestino irritable, etc. En cuadros más graves se puede observar delirio, alucinaciones, confusión y convulsiones. En muchos casos resulta difícil diferenciar si se trata de la reaparición del trastorno preexistente que dio lugar a la utilización del medicamento o es producto de la discontinuación del tratamiento, ya que muchas veces los síntomas característicos del síndrome de abstinencia suelen ser los mismos que dieron origen al tratamiento.

Considerando la amplia distribución de los receptores GABA-A y la selectividad de las BZDs por determinados subtipos de receptores, se han correlacionado los efectos farmacológicos y secundarios de estos medicamentos con las áreas del SNC donde ejercen su acción, como se muestra en la Figura 3 (Nothdurfter *et al.*, 2012).



En la literatura se puede encontrar una cantidad considerable de estudios centrados en el desarrollo de tratamientos efectivos para la dependencia, abstinencia o incluso adicción a BZDs. Hoy en día, a pesar de que no existen tratamientos exitosos para la dependencia a BZDs los médicos eligen discontinuar la administración del medicamento, realizando una reducción gradual de la dosis para evitar los síntomas del síndrome de abstinencia y así favorecer el cumplimiento del paciente con la interrupción de las BZDs (CADTH., 2015). Sin embargo, los síntomas de abstinencia ocurren incluso con una disminución lenta de la dosis a partir de dosis relativamente bajas de BZDs (Schweizer *et al.*, 1990; Lader, 1994), siendo la ansiedad el síntoma más difícil de prevenir o reducir (Podhorna, 2002; Himmerich *et al.*, 2007). En algunos estudios se combinó la reducción gradual de la dosis y terapias cognitivo-conductuales, sin embargo estas terapias conductuales apuntan a reducir la sintomatología preexistente por la cual se inició el tratamiento con BZDs, a través de por ejemplo grupos de apoyo para el tratamiento de ansiedad, o cambios en las rutinas de los pacientes que sufren

de insomnio, y no abarcan el problema de adicción a estos medicamentos (Baillargeon *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2004; O'Connor *et al.*, 2008).

ABUSO Y MAL USO DE LAS BENZODIACEPINAS:

Las BZDs se encuentran entre los medicamentos psicotrópicos más comúnmente recetados en todo el mundo y la prevalencia de su uso a largo plazo en la población general es del 2% al 7% (Lagnaoui *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2009; Olfson *et al.*, 2015). Los problemas asociados con el uso de las BZDs, además de los efectos adversos ya mencionados como tolerancia y dependencia, también se incluyen el mal uso, morbilidad y mortalidad relacionados con sobredosis y abstinencia (Dickinson *et al.*, 1990; Quaglio *et al.*, 2012).

El **mal uso** de medicamentos recetados significa tomar un medicamento de una manera o dosis diferente a la prescrita; utilizar la receta de otra persona, incluso para un problema médico legítimo; o tomar un medicamento para experimentar euforia (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2018). El aumento en el uso indebido de medicamentos recetados en los últimos 15 años se refleja en el incremento de las visitas a la salas de emergencias (Blanco *et al.*, 2007), y en las muertes por sobredosis asociadas con los medicamentos recetados (Jones & McAninch, 2015; Rudd *et al.*, 2016). Las razones de la alta prevalencia del uso indebido de medicamentos recetados varían según la edad, el sexo y otros factores como probablemente la facilidad de acceso. El uso no médico de este tipo de medicamentos es más alto entre los adultos jóvenes, de 18 a 25 años (Center for Behavioral Health Statistics and Quality, 2018).

El consumo de BZDs se está convirtiendo en un problema de salud pública debido a su uso indiscriminado. En Estados Unidos, la Red de Advertencia de Abuso de Drogas (DAWN- del inglés- Drug Abuse Warning Network) informó que en el 2011 más de 1,2 millones de las visitas al departamento de emergencias podrían atribuirse al uso no médico de medicamentos recetados, de las cuales el 28,7% incluía a las BZDs (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2013). Además, en el año

2013 se reportó que el 31% de muertes por sobredosis con medicamentos recetados incluyeron BZDs (Scholl *et al.*, 2018). El abuso de BDZs a menudo ocurre junto con otras sustancias adictivas (por ejemplo, alcohol o cocaína), lo que dificulta aún más los enfoques de tratamiento. Si bien la depresión del SNC y cardio-respiratoria rara vez caracterizan las sobredosis por BZDs orales (Welch *et al.*, 1977), su administración concomitante con alcohol o con otros medicamentos podría aumentar el riesgo de sobredosis mortal.

Por otro lado, aunque el uso de BZDs está justificado en muchas situaciones, la alta proporción de prescripciones inapropiadas incluyendo problemas relacionados con la dosis, la frecuencia, y principalmente el período de duración del tratamiento, como así también las interacciones medicamentosas graves, se observan entre la población adulta mayor. Hay reportes, que indican que en algunos casos aproximadamente el 70% de los pacientes recibieron una receta inapropiada (Preville *et al.*, 2012). Otros estudios en adultos (≥ 50 años) y adultos mayores (≥ 68 años) mostraron respectivamente, que el 35% y 40% presentaron una correcta prescripción, de los cuales en solo el 1,9% y 5,8% las BZDs fueron utilizadas en un correcto período de tiempo (Naloto *et al.*, 2016). En nuestro país las estadísticas muestran que de los pacientes que recibieron una prescripción médica para el uso de BZDs, el 60% de las mismas fueron realizadas por médicos no especialistas (SEDRONAR, 2017). Estos problemas sugieren que se deben desarrollar estrategias de prevención para informar a los adultos mayores, médicos, farmacéuticos y otros proveedores de atención médica sobre la importancia del uso apropiado de estos medicamentos (Preville *et al.*, 2012) y poder evitar el desarrollo de tolerancia, dependencia y la aparición del síndrome de abstinencia luego de la discontinuación del tratamiento con BZDs, que contribuyen al comportamiento adictivo por estos medicamentos.

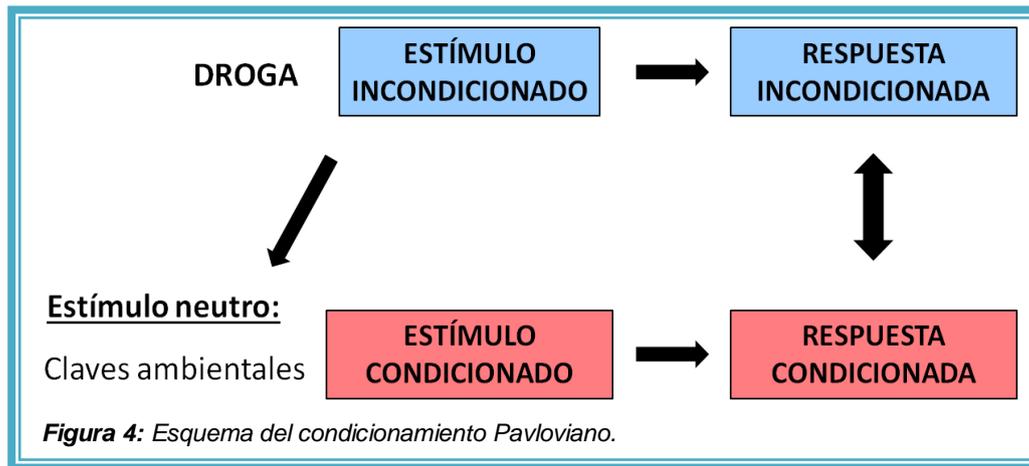
Actualmente, la Organización Mundial de la Salud considera a la adicción como una enfermedad del SNC, y aconsejó la sustitución del término adicción por el concepto más preciso y con menores connotaciones negativas de “*dependencia*”, sin embargo el término “*adicción*” (y “*adicto*”) está muy arraigado y frecuentemente se utiliza de forma más o menos equivalente al de dependencia (OMS, 1994). Se ha demostrado que el desarrollo y la expresión

persistente de comportamientos adictivos se producen mediante la usurpación de mecanismos naturales de aprendizaje y memoria dentro del sistema límbico, y las neuroadaptaciones resultantes de la exposición repetida a sustancias adictivas implican procesos de aprendizajes asociativos (Wolf, 2002; Taubenfeld *et al.*, 2010). El contexto ambiental de una experiencia inducida por una sustancia de abuso es crucial para el comportamiento de búsqueda y recaída en personas adictas (O'Brien *et al.*, 1992; Hyman & Malenka, 2001). Este hecho se sustenta en los principios del condicionamiento Pavloviano.

CONDICIONAMIENTO PAVLOVIANO

El condicionamiento Pavloviano es una forma de aprendizaje asociativo sobre la ocurrencia de dos eventos en forma simultánea; donde el individuo, más que aprender sobre las propiedades de un estímulo, aprende a asociar un estímulo con otro. Iván Pávlov demostró las bases del “condicionamiento clásico” observando la respuesta de salivación de un perro (respuesta incondicionada- RI) luego de darle comida (estímulo incondicionado- EI). Cada vez que Pavlov le colocaba comida hacía sonar una campana (estímulo neutro), de esta manera el perro asociaba el sonido de la campana con la comida (EI) y comenzaba a salivar (RI). Así el estímulo neutro se transforma por asociación en un estímulo condicionado (EC) generando una respuesta condicionada (RC, salivación). Por lo tanto la próxima vez que el perro escuchara la campana (EC), a pesar de la ausencia de comida, empezaría a salivar (RC).

Según estos principios, las drogas se utilizarían como un EI que generan un efecto en el organismo (RI). La administración de las drogas (EI) se produce en un ambiente con claves características de ese entorno (estímulo neutro). Luego por asociación el estímulo neutro puede convertirse en un EC capaz de provocar una respuesta condicionada (RC) similares a las generadas por el EI (Figura 4) (Pavlov, 1927).



A lo largo del tiempo, ciertas claves del ambiente comienzan a asociarse con el uso de la droga, hasta que las claves por sí solas son suficientes para estimular el deseo o la compulsión por consumir la misma. La exposición a determinadas claves contextuales que estuvieron presentes durante la administración de la droga, después de un periodo prolongado de la ausencia de droga, promueven que el individuo experimente nuevamente el síndrome de abstinencia. Estas manifestaciones de la abstinencia están relacionadas con las respuestas anticipatorias, dadas por el apareamiento de los estímulos incondicionados (droga) con los condicionados (claves contextuales), que pueden ser iguales u opuestas a los efectos que producen la droga. Se ha sugerido que estas respuestas condicionadas desempeñan un papel en la tolerancia a los medicamentos, la dependencia y la sensibilización (Wikler, 1973; Siegel, 1975; 1977; Perez *et al.*, 2002).

La inhibición latente (IL) es una forma de interferencia cognitiva o del aprendizaje, que se puede realizar mediante la pre-exposición al EC, que generalmente debilita el condicionamiento (RC). Al igual que otros protocolos de interferencia de aprendizaje, la IL se caracteriza por ser contexto-dependiente, lo que significa que la magnitud del efecto puede atenuarse cambiando el contexto durante las diferentes fases del procedimiento (Wasserman & Miller, 1997).

EL HIPOCAMPO

El hipocampo (HP) es una estructura cerebral que participa en el procesamiento de las asociaciones entre el contexto ambiental y los estímulos

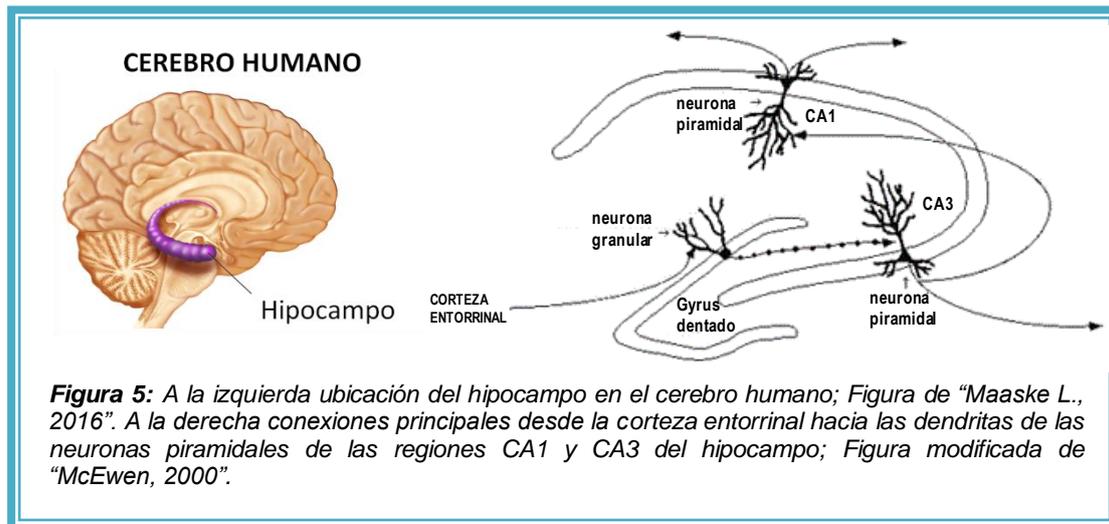
no condicionados (Kim & Fanselow, 1992), como las sustancias adictivas (Taubenfeld *et al.*, 2010; Kutlu & Gould, 2016).

Estructura anatómica del hipocampo:

El HP forma parte del sistema límbico y está localizado en el lóbulo temporal medial del cerebro. La corteza entorrinal es la mayor fuente de aferencias hacia el HP y está conectada con otras áreas de la corteza cerebral actuando de esta manera como interfaz entre esta estructura y otras partes del cerebro. En el HP se distinguen diferentes poblaciones neuronales (Reznikov, 1975; Amaral *et al.*, 1991; Knierim, 2015):

- Neuronas granulares, glutamatérgicas, cuyos axones son denominados fibras musgosas.
- Neuronas polimórficas, ubicadas debajo de las células granulares, en esta capa es donde ocurre la proliferación celular característica del hipocampo.
- Neuronas piramidales, también glutamatérgicas, que constituyen el tipo principal de neuronas en esta estructura.
- Interneuronas de tipo GABAérgicas, que se encuentran ampliamente distribuidas por todo el hipocampo y que expresan óxido nítrico sintasa.

El HP contiene neuronas piramidales cuyos cuerpos celulares se ubican en una capa única densamente empaquetada llamada Cuerno de Ammonis (CA), la cual se divide en tres regiones anatómicas principales: CA1, CA2 y CA3. El giro dentado (GD) es una banda estrecha de sustancia gris que sigue el borde interno del HP. El circuito excitatorio de esta estructura consiste en tres vías principales. Sin embargo, estas vías constituyen una simplificación de las conexiones sinápticas existentes dentro del HP y con otras áreas cerebrales. La información proveniente de estructuras corticales o subcorticales entra al GD a través de la vía perforante desde la corteza entorrinal. Desde las células granulares del GD la información es transmitida a las células piramidales del área CA3 a través de la vía de las fibras musgosas. Las neuronas del área CA3 envían proyecciones a las células piramidales del área CA1 a través de la vía de las colaterales de Schaffer. Finalmente, la información proveniente de las neuronas de CA1 retorna a estructuras corticales y subcorticales (Figura 5) (Purves *et al.*, 2004; Knierim, 2015).



Plasticidad sináptica: Potenciación a Largo Plazo

Las neuronas del HP presentan una forma de plasticidad sináptica que es requerida para la formación de memoria y de ciertos tipos de aprendizajes (Martin & Morris, 2002), entendiéndose por **plasticidad** a la capacidad de adaptarse y mejorar su eficiencia funcional en respuesta a estímulos que provienen del medio interno o externo. Los mecanismos que explican los fenómenos de plasticidad en la funcionalidad de un sistema son múltiples. Unos son de carácter neuroquímico; por ejemplo, el incremento en la liberación de neurotransmisores o mediadores en el espacio sináptico, cambios en la actividad de neuronas que influyen sobre la liberación pre-sináptica de los neurotransmisores, aumento del número de receptores post-sinápticos, cambios en la velocidad de inactivación del mediador y cambios en las cascadas de mensajeros intracelulares, entre otros eventos. Otras son de carácter anatómico, las cuales pueden ser más perdurables e incluso involucran cambios estructurales permanentes, por ejemplo, modificaciones en las espinas dendríticas y translocación de contactos sinápticos (Bi & Poo, 1998).

Las primeras sinapsis identificadas en cerebro de animales donde fue posible explicar los cambios que acontecen y son las bases de la plasticidad sináptica propia de algunos procesos de memoria, fueron las conexiones excitatorias entre el tracto perforante y las células granulares del GD hipocampal (Bliss & Lomo, 1973; Bliss & Collingridge, 1993). Cuando un estímulo de alta frecuencia es dado en esta vía excitatoria del HP, causa un

incremento sostenido en la eficiencia de la transmisión sináptica, incremento que puede durar por horas, y en un animal intacto por días o semanas. Esta facilitación se conoce como Potenciación a Largo Plazo (LTP -del inglés- “Long Term Potentiation”) y se caracteriza por un aumento duradero en la eficacia de la transmisión sináptica glutamatérgica siendo una forma importante de plasticidad sináptica. Además, el LTP es un fenómeno aceptado como un mecanismo molecular para el aprendizaje y la memoria en el cerebro en el que las señales contextuales son relevantes (Phillips & LeDoux, 1992; Martin *et al.*, 2000).

Mecanismos moleculares que participan en la generación de la Potenciación a Largo Plazo

El LTP en las sinapsis del GD y CA1 del HP requiere de la participación del glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC que, una vez sintetizado, se almacena en vesículas en las terminales pre-sinápticas de neuronas glutamatérgicas hasta la llegada de un potencial de acción, el cual provoca la fusión de dichas vesículas a la membrana pre-sináptica y la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico. Posteriormente el glutamato liberado actúa en las células blanco por unión a receptores ionotrópicos específicos que son de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) y kainato; o a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G activando segundos mensajeros. Durante la transmisión sináptica normal, o de baja frecuencia, los receptores AMPA son los responsables del nivel de despolarización de la membrana, ya que los canales de los receptores NMDA se encuentran bloqueados por Mg^{+2} . Solamente cuando la membrana de la célula post-sináptica es adecuadamente despolarizada por acción cooperativa y simultánea de varias neuronas pre-sinápticas, estos receptores son desbloqueados desplazando al ion Mg^{+2} del interior del canal, el cual queda libre para permitir un aumento de la conductancia de Ca^{+2} hacia el interior celular (Izquierdo & Medina, 1995; Nicoll & Malenka, 1995). Esta entrada masiva de Ca^{+2} en la célula post-sináptica desencadena una cascada de reacciones bioquímicas de gran trascendencia para la generación del LTP (Bliss & Collingridge, 1993). La concentración intracelular elevada de Ca^{+2}

activa diversas quinasas; proteína-quinasa A, proteína-quinasa C, proteína-quinasa M zeta (PKMz), quinasas dependiente de calcio como la Ca²⁺/calmodulina (CaMKII) y proteína-quinasa de tirosina, entre otras (Martin *et al.*, 2000), y genes de expresión temprana como Arc (del inglés- Activity Regulated Cytoskeleton-associated protein). Las quinasas mencionadas son las encargadas de fosforilar proteínas y activar ciertos factores de transcripción los cuales activan genes de acción tardía, de inicio más lento y mayor duración, capaces de codificar diversas proteínas, tales como fosfolipasa C, sinaptofisina, TrkA, TrkB (receptores para tirosina-quinasa tipo A y B respectivamente) y la subunidad NR2B del receptor NMDA (Izquierdo & Medina, 1997; Ahmed & Frey, 2005). Existen además mecanismos que, iniciados en el compartimento post-sináptico, actúan retrógradamente en la terminal pre-sináptica facilitando la liberación sostenida de glutamato desde la neurona pre-sináptica. Se ha postulado que uno de estos mecanismos es la producción de óxido nítrico (ON). La activación de la CaMKII induce la activación de la óxido nítrico sintasa neuronal (NOS-1) y por consiguiente la síntesis de ON, este mediador difunde al espacio sináptico y penetra en la pre-sinapsis para facilitar la liberación de glutamato (Burette *et al.*, 2002; Liddie *et al.*, 2013; Russwurm *et al.*, 2001).

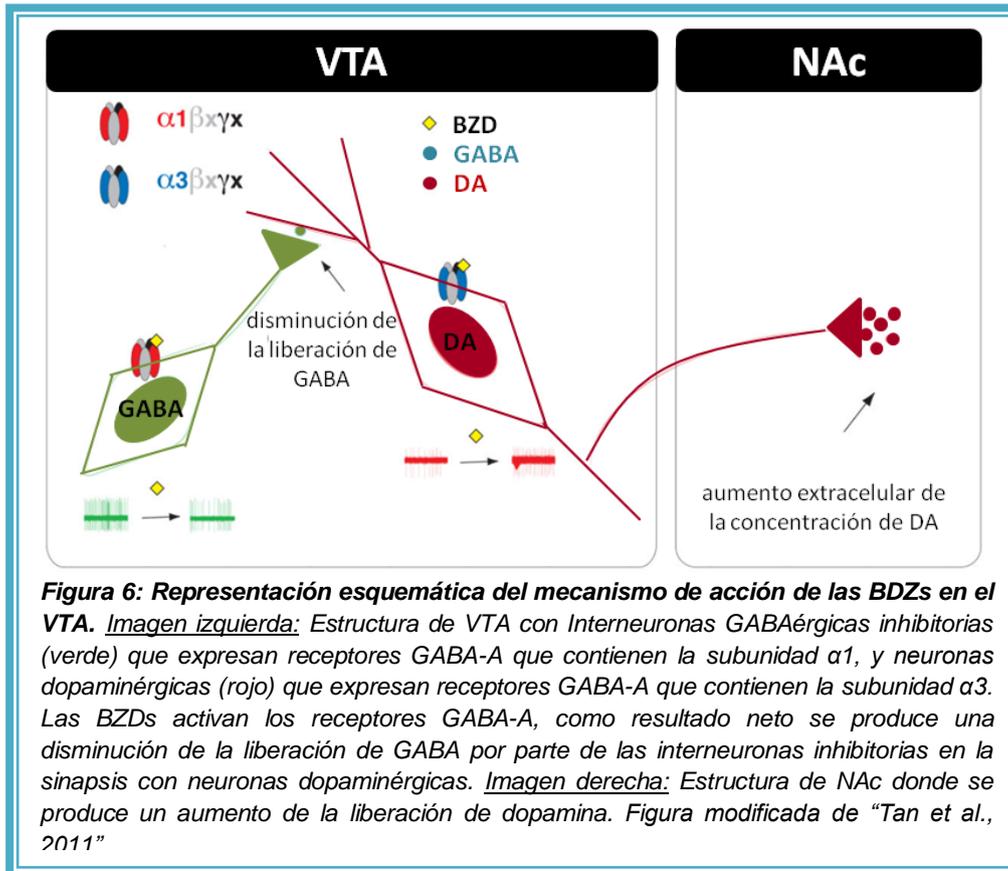
CIRCUITO DE RECOMPENSA:

Modulación funcional entre el hipocampo y el núcleo accumbens

La activación del circuito de recompensa es una característica común en respuesta a la administración de distintas sustancias que generan adicción. Este circuito es el sitio de convergencia de la información motivacional, emocional, contextual y afectiva, es decir, los tipos de comportamientos que subyacen a la búsqueda compulsiva de sustancias adictivas. Está conformado por interconexiones entre estructuras del SNC: el área tegmental ventral (VTA), la Corteza prefrontal y el Núcleo Accumbens (NAc). El NAc o estriado ventral, actúa como una interfaz entre los sistemas límbicos y motores (Groenewegen *et al.*, 1999; Wolf, 2002), y se divide funcional e histológicamente en dos subregiones el NAc *core* y el NAc *shell*. Se ha demostrado que el NAc *core* es particularmente importante en el aprendizaje instrumental como en la reinstalación de la conducta de auto-administración inducida por claves

asociadas al consumo de sustancias adictivas (McFarland & Kalivas, 2001). El *NAc shell* cumple un rol importante en la recompensa, las conductas motivacionales, la sensibilización conductual y los cambios en el estado afectivo (Zahm & Brog, 1992).

Las sustancias adictivas como los opioides (Johnson & North, 1992), cannabinoides (Szabo *et al.*, 2002), nicotina (Maskos *et al.*, 2005), cocaína y anfetaminas (Sulzer *et al.*, 2005), generan una “sensación de placer” debido a que usurpan el circuito de recompensa aumentando la liberación de dopamina (DA) en el NAc y otras áreas de este circuito, por estimulación de los cuerpos neuronales de DA en VTA o debido a que producen efectos similares a los de DA (Wolf *et al.*, 2004). Entonces, una función normal de DA puede ser ayudar a consolidar el aprendizaje de estímulo-respuesta, por lo que las personas adquieren el hábito de perseguir estímulos gratificantes (Wolf, 2002). Las **BZDs** también son capaces de generar este aumento agudo de DA en el NAc por un mecanismo de desinhibición, es decir que eliminan el “freno” de la transmisión inhibitoria sobre los cuerpos celulares de DA en el VTA que se proyectan al NAc. Estos estudios también reportaron que el potencial adictivo de las BDZs depende del sitio de unión de las BDZs en el receptor GABA-A que contiene la subunidad $\alpha 1$ en el VTA (Figura 6) (Tan *et al.*, 2011).



Las interconexiones entre estas áreas constituyen los principales circuitos neuronales implicados en la neurobiología de la adicción. Sin embargo, otras áreas del cerebro, tales como el HP y la amígdala, están implicados en la iniciación y mantenimiento de la adicción a drogas (Eisch & Mandyam, 2004). La gran mayoría de las conexiones aferentes que recibe el NAc son de tipo glutamatérgicas, provenientes de la corteza pre-frontal, la amígdala y del HP (Floresco, 2015), el cual proporciona información espacial y contextual acerca de diferentes estímulos (Brog *et al.*, 1993; Sesack & Grace, 2010). Por lo tanto, los cambios en la actividad neuronal del NAc que pueden conducir a patrones de comportamiento relevantes para la motivación son probablemente el resultado neto de aumentos/disminuciones en las aferencias glutamatérgicas (Floresco, 2015).

La transmisión sináptica glutamatérgica dentro del NAc ha sido reconocida como el blanco principal de las sustancias adictivas para producir cambios sinápticos adaptativos y modular la producción del comportamiento (Han & Lu, 2016). En este sentido, ciertos estudios demostraron que las

sinapsis de las terminales glutamatérgicas del HP en el NAc también experimentan cambios neuroplásticos como el fenómeno del LTP, el cual es necesario para la formación de recuerdos contextuales relacionados con la recompensa (LeGates *et al.*, 2018). Por su parte, el NAc también modula la plasticidad en el HP, es decir que estas estructuras se regulan funcionalmente de forma bi-direccional (Lopez *et al.*, 2008). También se demostró que los astrocitos regulan la plasticidad sináptica glutamatérgica en el NAc controlando la concentración extracelular de glutamato a través de la captación y liberación coordinadas (Kalivas, 2009).

Si bien la mayoría de las investigaciones que involucran cambios neurofisiológicos en las neuronas en los procesos de adicción, como en los fenómenos de aprendizaje y memoria, se han centrado en la plasticidad sináptica, también hay una evidencia creciente de la importancia de la plasticidad celular. La plasticidad celular, también conocida como plasticidad homeostática, implica cambios en la excitabilidad intrínseca de una célula nerviosa de una manera que no es específica de la sinapsis. Dado que ciertas características de la adicción a sustancias implican una mayor o menor sensibilidad a la misma, tiene sentido que la excitabilidad eléctrica mejorada o reducida de ciertas células nerviosas contribuya a estas adaptaciones conductuales (Chen *et al.*, 2013).

EL ÓXIDO NÍTRICO:

El descubrimiento de la función del ON como una molécula de señalización en el sistema nervioso cambió radicalmente el concepto de la comunicación neuronal (Esplugues, 2002). Las propiedades físicas del ON impiden su almacenamiento en vesículas celulares y su metabolismo mediante enzimas hidrolíticas, a diferencia de los neurotransmisores “clásicos”. El ON se sintetiza por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS -del inglés- nitric oxide synthase) dependiendo de su demanda y difunde desde las células donde se produce. Aunque su vida media es de unos pocos segundos, es capaz de difundir ampliamente, entre 10 – 300 μm de diámetro (Lancaster, 1994), lo cual conlleva a que las estructuras cercanas a las células que lo

producen, tanto neuronas como glía, vasculatura, etc., estén influenciadas por su liberación, ya que puede atravesar las membranas celulares con facilidad. Esto implica que, además de actuar como un neurotransmisor, el ON tiene un papel neuromodulador (Garthwaite & Boulton, 1995). La particularidad de poder difundir dentro de las células le permite interactuar con las dianas intracelulares que normalmente son consideradas mensajeros secundarios. Asimismo, a diferencia de los neurotransmisores convencionales, en los cuales su actividad termina mediante mecanismos de recaptación o por degradación enzimática, la inactivación del ON se produce cuando éste reacciona con un sustrato (Esplugues, 2002).

La síntesis de ON en el cerebro surge de la conversión de L-arginina en L-citrulina mediante la NOS. Se han identificado tres isoformas principales de NOS: neuronal (nNOS o NOS-1), endotelial (eNOS o NOS-3) ambas de expresión constitutiva y dependientes de calcio, y la isoforma inducible (iNOS o NOS-2) (Bredt & Snyder, 1994). En el SNC, la isoforma de la NOS más abundante es la NOS-1, aunque NOS-3 y NOS-2 también están presentes (Esplugues, 2002). Además, todos los tipos celulares del SNC pueden contener la enzima; la NOS-1 se expresa fundamentalmente en determinadas poblaciones neuronales y astrogiales; la NOS-3 se encuentra principalmente en el endotelio de los vasos sanguíneos, pero también se puede localizar en ciertas neuronas, mientras que la expresión de la NOS-2 se localiza en la microglía y los astrocitos (Knowles & Moncada, 1994; Heneka & Feinstein, 2001). Aunque la NOS-1 presenta tres variantes principales: NOS-1 α (150-kDa), NOS-1 β (136-kDa) y NOS-1 γ (125-kDa) (Brenman & Bredt, 1997), la NOS-1 α representa la mayoría de la actividad catalítica de NOS-1 en el cerebro, ya que se observó que cuando se elimina NOS-1 α en ratones, hay una reducción en el 95% de la actividad catalítica de NOS (Huang *et al.*, 1993).

La vida media del ON en sistemas biológicos es de unos cuantos segundos a temperatura ambiente (alrededor de 10, 30, o hasta 50 segundos) (Edelman & Gally, 1992; Clarkson *et al.*, 1995; Wink *et al.*, 1996), ya que se oxida formando nitritos y nitratos (Bugha *et al.*, 1996; Salter *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 2002), los cuales son los metabolitos estables de este gas.

El óxido nítrico en el sistema nervioso central

En el SNC, el ON se produce principalmente en interneuronas nitrérgicas locales ubicadas en diversas estructuras cerebrales (Bredt *et al.*, 1990). La activación de receptores glutamatérgicos del tipo NMDA y AMPA promueven la síntesis de ON. La NOS-1 se une a través de la proteína de densidad postsináptica PSD95 a la subunidad NR2B del receptor NMDA (Brenman & Bredt, 1997), cuando este receptor se activa, el Ca^{2+} que entra a la célula a través de él se une a calmodulina y como consecuencia se activa la enzima NOS-1 y aumenta la producción de ON (Liddie *et al.*, 2013). Una vez sintetizado, el ON interacciona rápidamente con su principal diana fisiológica, la guanilatociclasa (GCs) (Russwurm *et al.*, 2001) que puede localizarse pre-sinápticamente, mientras que la NOS-1 está situada post-sinápticamente, por lo que el ON actuaría como un neurotransmisor retrógrado (Burette *et al.*, 2002). Asimismo, la NOS-1 puede localizarse en prolongaciones muy próximas a otras sinapsis, pudiendo modular tanto la liberación de neurotransmisores por parte del terminal pre-sináptico como la respuesta de la célula post-sináptica (Kiss & Vizi, 2001; West *et al.*, 2002).

El ON puede activar diferentes vías de señalización: activa la enzima GCs estimulando la producción de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y además puede reaccionar directamente con proteínas que contengan grupos sulfhidrilos de cisteína, fenómeno que se denomina S-nitrosilación de proteínas (Stamler *et al.*, 2001; Garthwaite, 2008; Mustafa *et al.*, 2009; Garthwaite, 2010).

Funciones del óxido nítrico

En el SNC, el ON participa en el desarrollo embrionario (Bredt & Snyder, 1994), y en distintos procesos, como la nocicepción (Moore *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1993), la ansiedad (Quock & Nguyen, 1992), la actividad convulsiva (Kaputlu & Uzbay, 1997), la ingesta de alimentos (Morley & Flood, 1991), en la neurotoxicidad asociada a diversos procesos neurodegenerativos y en la transmisión sináptica (Yun *et al.*, 1996; Bruckdorfer, 2005). Además, el ON también influye en la regulación de liberación de neurotransmisores como el GABA, acetilcolina, DA, serotonina (Guix *et al.*, 2005) y glutamato (Sequeira *et*

al., 1997). También se ha demostrado que el ON cumple un rol fundamental en procesos de aprendizaje y memoria (Park *et al.*, 1998) y en el mantenimiento del LTP en el HP (Bon & Garthwaite, 2003). En el NAc se ha demostrado que el ON modula la actividad de la membrana y las propiedades electrofisiológicas de las principales neuronas de esta estructura (West & Grace, 2004).

Por lo tanto, existe una creciente evidencia de que el ON es un componente crítico de la respuesta del SNC a una variedad de estímulos. Numerosos estudios demostraron que el ON participa en el desarrollo de la dependencia de algunas sustancias adictivas, como los opioides (Vaupel *et al.*, 1995; Gabra *et al.*, 2005), etanol (Uzbay *et al.*, 1997), nicotina (Jain *et al.*, 2008), cafeína (Kayir & Uzbay, 2004), cannabinoides (Azad *et al.*, 2001), anfetaminas (Itzhak *et al.*, 2004), cocaína (Gabach *et al.*, 2013; Artur de la Villarmois *et al.*, 2019) y BZDs (Talarek *et al.*, 2011). Estas evidencias, sugieren que el ON podría ser un mecanismo en común en las neuroadaptaciones generadas durante la dependencia a estas sustancias adictivas.

MARCO TEÓRICO PARA EL DESARROLLO DE LA HIPÓTESIS

Experimentos previos del laboratorio han demostrado que el desarrollo de tolerancia al efecto sedante y la dependencia a DZ son procesos de aprendizaje de tipo asociativo, donde las claves contextuales que acompañan la administración de DZ cumplen un rol fundamental. También se observó que estos procesos están asociados a un incremento en la plasticidad sináptica en el HP, evidenciado como una reducción en el umbral para generar LTP en el GD. A nivel molecular, se demostró que el incremento en la plasticidad sináptica, tanto en animales tolerantes como dependientes a DZ, coincide con una sobre-expresión del ARNm que codifica para las subunidades NR1 y NR2B del receptor glutamatérgico de tipo NMDA en dicha estructura (Perez *et al.*, 2002). Los cambios en la composición de estas subunidades del receptor NMDA podrían contribuir con los efectos reforzantes de sustancias adictivas cuando se sobre-expresan en el NAc y en el HP, entre otras estructuras relacionadas con el circuito de la recompensa (Bajo *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2007). Estos efectos no se observaron cuando se co-administró un antagonista no competitivo del receptor NMDA (MK-801),

impidiendo tanto el desarrollo de tolerancia condicionada a DZ, la sobreexpresión de las subunidades del receptor NMDA, la generación del LTP en el HP (Almiron *et al.*, 2004), y la dependencia a DZ. Además, se demostró que el efecto ansiogénico, característico del síndrome de abstinencia a DZ, estuvo acompañado por un incremento en la actividad de las neuronas noradrenérgicas del Locus Coeruleus (Perez *et al.*, 2001) y las neuronas serotoninérgicas del Núcleo del Rafe Dorsal (Almiron & Ramirez, 2005). Todos estos cambios pueden contribuir tanto a los signos físicos del síndrome de abstinencia que involucran funciones autonómicas y a la ansiedad observada, como al aumento en la plasticidad sináptica en el HP, que subyacen a la dependencia y abstinencia a DZ (Perez *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2009; Monti *et al.*, 2010).

Por otro lado, como se mencionó en los mecanismos moleculares del LTP (ver página 26), la entrada masiva de Ca^{+2} en la célula post-sináptica luego de la activación del receptor NMDA, desencadena una cascada de reacciones bioquímicas, activando diversas quinasas (Martin *et al.*, 2000). Las quinasas son las encargadas de fosforilar proteínas y activar ciertos factores de transcripción. Uno de estos intermediarios es Arc, el cual está involucrado en procesos de plasticidad sináptica inducidos por actividad neuronal vinculada a procesos de aprendizaje y memoria espacial (Tzingounis & Nicoll, 2006) que promueven la expansión local del citoesqueleto de actina (Messaoudi *et al.*, 2007). Otra quinasa cuya fosforilación y activación sostenida es necesaria para el mantenimiento del LTP en el HP y de memorias de larga duración es la PKMz (Serrano *et al.*, 2005). Luego de que se conoció que la polimerización de actina es crítica para la síntesis de PKMz se ha propuesto una relación entre Arc, PKMz y el LTP, llevando a un grupo de autores a sugerir la posibilidad de un mecanismo secuencial de mantenimiento del LTP, en el que la estabilización de actina dependiente de Arc promueve la síntesis de PKMz y la expresión del LTP (Kelly *et al.*, 2007; Messaoudi *et al.*, 2007). Esta cascada de señalización intracelular fue estudiada en el grupo de investigación, y se demostró que el desarrollo de dependencia condicionada a DZ está asociada a un aumento de células positivas para Arc en el HP dorsal, y que la PKMz participa en este proceso, ya que la inhibición de PKMz fue capaz de prevenir

el comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ y la facilitación en la plasticidad sináptica asociada, aportando evidencias en torno a una posible participación de esta quinasa en el mantenimiento de memorias relacionadas a los efectos de sustancias adictivas (Monti *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2012).

Otro intermediario importante en la excitabilidad neuronal y en la plasticidad sináptica en el HP y otras áreas del cerebro es el ON (Prast & Philippu, 2001). Conductualmente, se ha demostrado que la administración aguda de inhibidores no selectivos de NOS atenúa algunos de los signos del síndrome de abstinencia a BZDs en ratas y ratones, como las convulsiones inducidas por pentetrazol, la hipermotilidad y la disminución del peso corporal (Talarek *et al.*, 2011). Sin embargo, no se ha descrito el rol del ON en la expresión de ansiedad como signo del síndrome de abstinencia a BZDs, ni en los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno.

Entonces, si el desarrollo de dependencia a DZ es un proceso de aprendizaje dependiente del contexto y este proceso está asociado con un aumento del LTP en el HP; teniendo en cuenta que el ON es un intermediario esencial para el mantenimiento del LTP como para procesos de aprendizajes asociativos en el HP, y que el HP y el NAc se regulan funcionalmente de manera bi-direccional contribuyendo a las conductas reforzantes inducidas por sustancias adictivas, se podría **hipotetizar** que: **la interferencia del proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia a DZ puede revertir los cambios plásticos dependientes del ON en el HP evitando la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ. Además, debido a la participación del NAc en los efectos reforzantes de las BZDs, la abstinencia a DZ induce cambios en la plasticidad celular y en la transmisión nitrérgica en esta estructura.**

OBJETIVOS

Con el fin de identificar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la dependencia a DZ, el **OBJETIVO GENERAL** de este trabajo es prevenir la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ, caracterizando los cambios plásticos en estructuras cerebrales que participan en procesos de aprendizaje asociativo y de recompensa, como el HP y el NAc a través de mecanismos mediados por el ON.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO I: Interferir con el proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia a DZ utilizando un protocolo de interferencia cognitiva para prevenir la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ.

OBJETIVO II: Caracterizar el impacto de la interferencia cognitiva en las variaciones de la excitabilidad neuronal descritas en el HP luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ.

OBJETIVO III: Caracterizar la participación del ON luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ, determinando si la interferencia cognitiva afecta la expresión de NOS-1 en el HP.

OBJETIVO IV: Determinar si la inhibición farmacológica de NOS-1 desencadena los cambios comportamentales y electrofisiológicos observados con la interferencia cognitiva.

OBJETIVO V: Caracterizar los cambios en la plasticidad sináptica funcional y estructural, y en la neurotransmisión nitrérgica en el NAc, luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ.

Con el objetivo de que la lectura de este trabajo sea más fluida, se utilizaron frases como: “expresión de ansiedad”, “expresión de abstinencia”, “animales dependientes”, “animales ansiosos” o “comportamiento ansioso”, las cuales hacen referencia al comportamiento de “tipo ansioso” como uno de los síntomas característico del síndrome de abstinencia, luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ.

MÉTODOS GENERALES

MÉTODOS GENERALES:

Sujetos experimentales: Se utilizaron ratas Wistar macho de 35 días de edad al comienzo del tratamiento con el propósito de mimetizar la adolescencia en humanos (Caballero & Tseng, 2016). Esta edad fue seleccionada considerando que los desórdenes de ansiedad son altamente prevalentes en los jóvenes y están asociados a una alta morbilidad y un riesgo incrementado de intentos de suicidio o comportamientos autolesivos (Foley *et al.*, 2006; Jacobson *et al.*, 2008; Merikangas *et al.*, 2010; Kessler *et al.*, 2012). Las BZDs son prescriptas comúnmente para el tratamiento de estos trastornos aunque no constituyen el tratamiento de primera línea (Wehry *et al.*, 2015). Además, reportes recientes indican que los sedantes y tranquilizantes constituyen casi el 10 % de todos los medicamentos de prescripción utilizados de manera recreacional por los adolescentes (NIDA, 2015), siendo el rango etario de 18-25 años el que presenta un mayor consumo no médico de BZDs (Maust *et al.*, 2019).

Los animales fueron obtenidos por endocría en el bioterio del Departamento de Farmacología, de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC (IFEC-CONICET) y mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (horas de luz de 7:00 a 19:00 hs) a una temperatura de 22°C ± 2°C. Se alojaron en grupos de 3 o 4 individuos en cajas de plástico estándar de laboratorio, con disponibilidad permanente de agua y alimento (dieta comercial balanceada para ratas y ratones de laboratorio). Los procedimientos experimentales fueron realizados entre las 9:00 y 12:00 hs. Los animales fueron habituados al contacto con el experimentador, para ello fueron trasladados a una habitación diferente, manipulados y luego devueltos a sus cajas y a su sala de alojamiento común. Este procedimiento se repitió durante los 6 días previos a iniciar los tratamientos experimentales. Las ratas fueron asignadas al azar a los distintos grupos experimentales y cada una fue utilizada una sola vez.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a la Guía de uso y cuidado de Animales de laboratorio (NIH Publicación N° 80-23, revisado 1996) y aprobados por el CICUAL-FCQ- Universidad Nacional de Córdoba (RES-48-2015).

Drogas utilizadas en animales: Se utilizaron ampollas de DZ disponibles comercialmente (10mg/2ml, Klonal SRL, Argentina); Vehículo (VEH), que contiene agua destilada, Tween 80 (0,3%, Sigma Aldrich-Fluka, Argentina) y propilenglicol (5%, Sintorgan SA, Argentina); solución Salina (0,9 % NaCl); 7-Nitroindazole (7-NI, Sigma Aldrich, Argentina) diluido en Cremophor EL (Sigma Aldrich, Argentina) al 10% y en solución salina.

El DZ se utilizó en una dosis sedante de 5 mg/kg/día, ya que trabajos previos del laboratorio demostraron la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ, luego de la interrupción de la administración crónica (18 días) de DZ (5 mg/kg) (Perez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002; Monti *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2012). La selección de la dosis de 7-NI se basó en antecedentes que demostraron que la administración de 7-NI (30mg/kg) por vía intraperitoneal (i.p.) en ratas, fue capaz de inhibir la actividad de la enzima NOS en el estriado, cerebelo, HP, corteza y bulbo olfatorio, por lo tanto se decidió utilizar una dosis de 50 mg/kg para asegurar la inhibición completa de la enzima (MacKenzie *et al.*, 1994). Además, en resultados de previos se demostró que la administración de 50 mg/kg/día de 7-NI por vía i.p. no afectó la actividad locomotora de ratas (Nasif *et al.*, 2011; Gabach *et al.*, 2013).

Estadística: Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico *GraphPad Prism 6*. El tipo de análisis que se utilizó se detalla en cada capítulo en la sección de resultados. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (error estándar de la media) y el nivel de significancia utilizado fue de un valor de $p < 0,05$. Todas las comparaciones de las medias fueron realizadas con el test a *posteriori* *Newman-Keuls*. Con el objetivo de verificar la homogeneidad de varianza se utilizaron los test de "Brown-Forsythe" y de "Bartlett's", una vez que se verificó que los datos a analizar cumplían con el criterio de distribución normal se realizaron los correspondientes test paramétricos utilizados a lo largo de esta tesis.

Las metodologías específicas de cada técnica y los diseños experimentales, se desarrollan dentro de cada objetivo según corresponda.

OBJETIVO I

OBJETIVO I

Interferir con el proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia a DZ utilizando un protocolo de interferencia cognitiva para prevenir la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ.

ANTECEDENTES:

El contexto ambiental de una experiencia inducida por una droga de abuso es crucial para el comportamiento de búsqueda de la droga y la recaída al consumo en humanos adictos (Hyman & Malenka, 2001). Además, el aprendizaje y la memoria, particularmente las memorias contextuales, son importantes para el establecimiento de respuestas condicionadas a las drogas de abuso (Hyman & Malenka, 2001; Taubenfeld *et al.*, 2010).

Existen reportes clínicos y de laboratorio que indican que la exposición a determinadas claves contextuales que estuvieron presentes durante la administración de la droga, después de un período prolongado de ausencia de exposición a la misma, promueven a que el individuo experimente nuevamente el síndrome de abstinencia. Esas manifestaciones de la abstinencia pueden estar relacionadas con las respuestas anticipatorias, dadas por el apareamiento de los estímulos incondicionados (droga) con los condicionados (olores, pinchazos), que pueden ser iguales u opuestas a los efectos que produce la droga.

Resultados previos demostraron que un tratamiento de 18 días con DZ en ratas Wistar produce el desarrollo de dependencia, la cual se pone en evidencia luego de la discontinuación del tratamiento y la consecuente aparición de un signo del síndrome de abstinencia, caracterizado por un comportamiento de “tipo ansioso” (Perez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002) que es evidente hasta 4 días después de la interrupción de la administración de DZ (Monti *et al.*, 2010). Este signo característico del síndrome de abstinencia puede ser evidenciado nuevamente luego de dos semanas de la interrupción del fármaco, cuando los mismos animales son re-expuestos a las claves contextuales que habían estado presente la primera vez que mostraron un

comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ (Monti *et al.*, 2010). Por otro lado, se reportó que al cambiar las claves contextuales que acompañaron la administración crónica de DZ, no se evidenció un comportamiento de “tipo ansioso” como indicador del síndrome de abstinencia, cuando este fue evaluado 1 o 15 días después de la interrupción del fármaco (Perez *et al.*, 2002; Monti *et al.*, 2010). También, se demostró que la pre-exposición al contexto de administración impidió el desarrollo de tolerancia al efecto hipolocomotor después de 4 días de administración de DZ (Marin *et al.*, 1999).

Estos resultados concuerdan con la teoría de que un aprendizaje asociativo, específico del contexto, subyace al desarrollo de tolerancia y dependencia a DZ. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó si la interferencia de este condicionamiento mediante un protocolo de inhibición latente (pre-exposición al contexto de administración de DZ) durante los últimos días de un tratamiento crónico es capaz de prevenir la expresión de ansiedad como manifestación del síndrome de abstinencia.

MÉTODOS:

Protocolos de administración:

Protocolo de Inhibición Latente: Los animales fueron inyectados diariamente por vía i.p. con DZ (5 mg/kg) o VEH durante 18 días (Figura 7). Durante los últimos 5 días fueron pre-expuestos al contexto de administración de DZ, donde recibieron una inyección i.p. de solución salina **30 minutos antes** de la administración de DZ o VEH, obteniendo los grupos experimentales IL-DZ e IL-VEH.

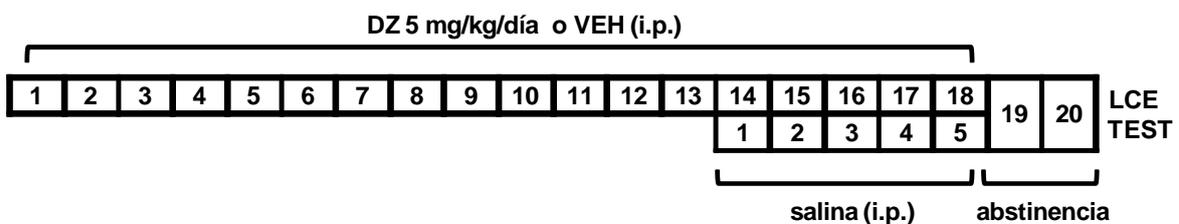


Figura 7: Esquema que muestra el diseño experimental utilizado para el protocolo de inhibición latente. LCE (Laberinto en cruz elevado).

Protocolo Control: Los animales recibieron dos inyecciones (i.p.) simultáneas durante 18 días. Los primeros 13 días, recibieron una inyección sin solución (solo pinchazo: simulación de administración) y la otra inyección con DZ o VEH. En los últimos 5 días del tratamiento fueron administrados de forma simultánea con DZ o VEH y solución salina, obteniendo los grupos experimentales C-DZ y C-VEH.



Figura 8: Esquema que muestra el diseño experimental utilizado para el protocolo control. LCE (Laberinto en cruz elevado).

Con el objetivo de preservar las claves ambientales que acompañaron a la administración de DZ, todas las inyecciones y manipulación que recibieron los animales fueron realizadas por el mismo operador, en la misma ubicación de la sala de inyección y con un paño de tela específico utilizado durante todo el tratamiento.

Diferentes ensayos clínicos han demostrado que los signos que mejor caracterizan el síndrome de abstinencia, y por lo tanto demuestran la dependencia a BZDs luego de discontinuar el tratamiento crónico, son: la ansiedad, el espasmo muscular y las convulsiones (Woods *et al.*, 1987; 1992). Además, el tiempo de vida media del DZ en ratas cuando se administra por vía i.p., es de 0,89 y 0,88 horas en el cerebro y en el plasma respectivamente (Friedman *et al.*, 1986). Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” como manifestación del síndrome de abstinencia en ausencia de DZ circulante en plasma o cerebro. Para ello, todos los animales fueron evaluados en el Laberinto en Cruz Elevado 48 horas después de la última administración de DZ.

Laberinto en cruz elevado:

El laberinto en cruz elevado (LCE) consiste en dos brazos abiertos (BA) opuestos y dos brazos cerrados (BC) también opuestos, con paredes de 40 cm de alto, sin techo. Los brazos (50 x 10cm) se encuentran enfrentados de tal manera que forman una cruz y en el medio se encuentra una plataforma central de 10 x 10 cm. Todo el aparato se encuentra elevado a 50 cm del suelo (Figura 9). Este test, validado para medir un “índice del nivel de ansiedad” en roedores (Pellow *et al.*, 1985; Pellow & File, 1986), está basado en la tendencia natural de estos animales a permanecer en la oscuridad, en los lugares cerrados y por su aversión innata a la exposición a las alturas o a los espacios abiertos. Como consecuencia, las ratas expuestas al LCE tienden a evitar los brazos abiertos y a permanecer más tiempo en los brazos cerrados. El LCE fue colocado en una habitación con bajo nivel de ruido y los animales fueron habituados a la sala durante 1 hora antes de ser testeados. Durante el test, el animal es colocado en la plataforma central y se lo deja explorar libremente durante 5 minutos, en este punto al animal se le presenta el conflicto de salir a explorar libremente a los brazos abiertos o permanecer resguardado y seguro en los brazos cerrados. El porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA), el número de entradas en los brazos abiertos y el número de llegadas a los extremos de los brazos abiertos, son tomados en conjunto como un “índice del nivel de ansiedad”, siendo el %TA el parámetro más comúnmente empleado como indicador de ansiedad. El número de entradas en los brazos cerrados está relacionado con la actividad locomotora y representa una medida de la misma. Luego de testear a cada animal el LCE se limpia con una solución de alcohol 70%. El criterio a utilizar para clasificar a los animales en dependientes o no dependientes fue caracterizado y utilizado previamente por el grupo de investigación. Aquellos animales que recibieron DZ y cuyo valor de %TA es comparable con el grupo control (VEH) son considerados como animales no dependientes (DZ-ND), mientras que aquellos animales que recibieron DZ y presentan un %TA menor o igual al 12% son considerados como animales dependiente (DZ-D) (Perez *et al.*, 2002).

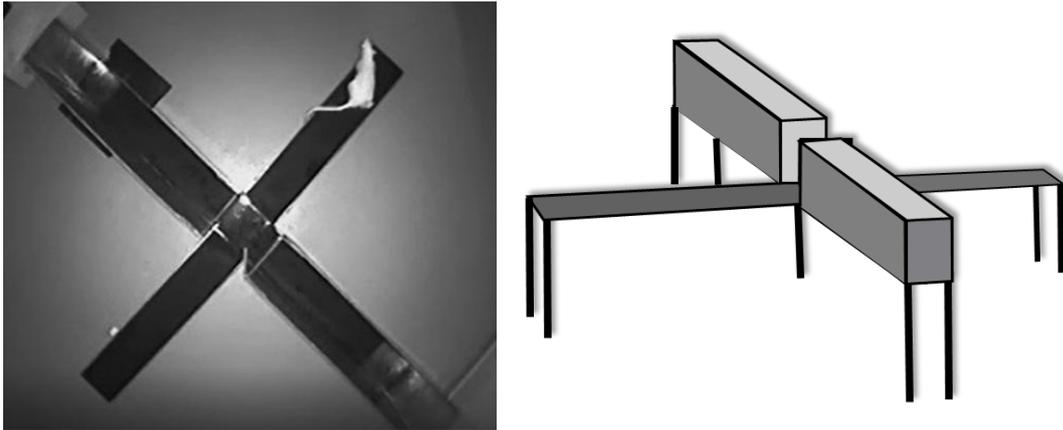


Figura 9: Laberinto en cruz elevado. A la izquierda se muestra una foto tomada del LCE durante un experimento. A la derecha se muestra un esquema representativo del LCE. En ambas figuras se pueden observar los brazos abiertos, los brazos cerrados y la plataforma central donde se coloca el animal.

Test de campo abierto:

Para evaluar si la administración crónica de DZ altera la actividad locomotora espontánea, se utilizó un grupo diferente de animales los cuales recibieron DZ o VEH utilizando el protocolo Control. Cuarenta y ocho hs después de la última administración los animales fueron testeados en la prueba de campo abierto. El aparato empleado consiste en una caja de madera cuadrada (60 x 60 x 60 cm), cuya base está pintada de gris y dividida por finas líneas negras, en 16 cuadrados idénticos e iluminada por dos bombillas (100-W entre ambas), con una cámara de video digital entre ellas. La caja fue colocada en una habitación con bajo nivel de ruido y las ratas fueron habituadas a la sala durante 1 h antes de ser testeadas. Cada animal fue colocado en la caja de madera de forma individual y evaluado durante 10 minutos. La actividad locomotora de cada animal se cuantificó midiendo el número de cuadrados que el animal cruza mientras camina, considerando que cruza de un cuadrado a otro cuando pasan sus cuatro patas.

RESULTADOS:

La inhibición latente evita la expresión del comportamiento de "tipo ansioso" característico del síndrome de abstinencia de DZ.

El ANOVA de dos vías del %TA muestra un efecto significativo del tratamiento (VEH vs. DZ) [$F_{(1, 50)} = 7,09$; $p = 0,0104$] y del protocolo (control vs.

IL) [$F_{(1, 50)} = 4,57$; $p=0,0375$], sin efecto de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 50)} = 0,81$; $p=0,3718$; Figura 10-A]. En el protocolo control, el análisis a *posteriori* muestra que el %TA fue significativamente menor en el grupo C-DZ ($14,5 \pm 2,4$) cuando se comparó con el grupo C-VEH ($25,9 \pm 1,7$; $*p<0,05$); mientras que en el protocolo de IL no se encontraron diferencias significativas entre los grupos IL-DZ ($24,2 \pm 3,3$) e IL-VEH ($29,9 \pm 3,4$; $p>0,05$). Además se observó que el %TA en el grupo C-DZ fue significativamente menor que en el grupo LI-DZ ($*p<0,05$), y no se encontraron diferencias entre los grupos C-VEH, LI-VEH y LI-DZ ($p>0,05$). Cuando se analizó el número de entradas en los BA (Figura 10-B), el ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del protocolo [$F_{(1, 50)} = 5,84$; $p= 0,0193$], sin efecto del tratamiento [$F_{(1, 50)} = 3,03$; $p=0,0878$] ni de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 50)} = 1,98$; $p=0,1656$]. El análisis *Newman-Keuls* indicó que en el protocolo Control, el número de entradas en los BA fue significativamente menor en C-DZ ($2,3 \pm 0,4$) cuando se comparó con C-VEH ($3,8 \pm 0,4$; $*p<0,05$); mientras que en el protocolo de IL no se encontraron diferencias significativas entre IL-DZ ($4,1 \pm 0,5$) e IL-VEH ($4,3 \pm 0,6$; $p>0,05$). Además, este parámetro fue significativamente menor en el grupo C-DZ cuando se comparó con IL-DZ ($*p<0,05$), y no se encontraron diferencias entre los grupos IL-DZ, IL-VEH y C-VEH ($p>0,05$). Por otro lado, el análisis de las llegadas a los extremos de los BA (Figura 10-C), evidenció un efecto significativo del protocolo [$F_{(1, 50)} = 6,51$; $p=0,0139$], sin efecto del tratamiento [$F_{(1, 50)} = 0,18$; $p=0,6736$] ni de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 50)} = 1,29$; $p=0,2617$]. El test a *posteriori* indicó que las llegadas a los extremos fueron significativamente menores en el grupo C-DZ ($1,5 \pm 0,3$) cuando se comparó con el grupo IL-DZ ($3,2 \pm 0,5$; $*p<0,05$), sin diferencias significativas cuando se comparó con los grupos C-VEH ($2,2 \pm 0,4$; $p>0,05$) e IL-VEH ($2,9 \pm 0,5$; $p>0,05$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos IL-DZ, IL-VEH y C-VEH ($p>0,05$). Por otro lado cuando se analizó el número de entradas en los BC (Figura 10-D), el ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo del protocolo [$F_{(1, 50)} = 2,41$; $p=0,1268$], del tratamiento [$F_{(1, 50)} = 0,62$; $p=0,4343$], ni de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 50)} = 2,41$; $p=0,1268$], indicando que no se evidenciaron cambios en la actividad locomotora en el LCE entre los grupos experimentales.

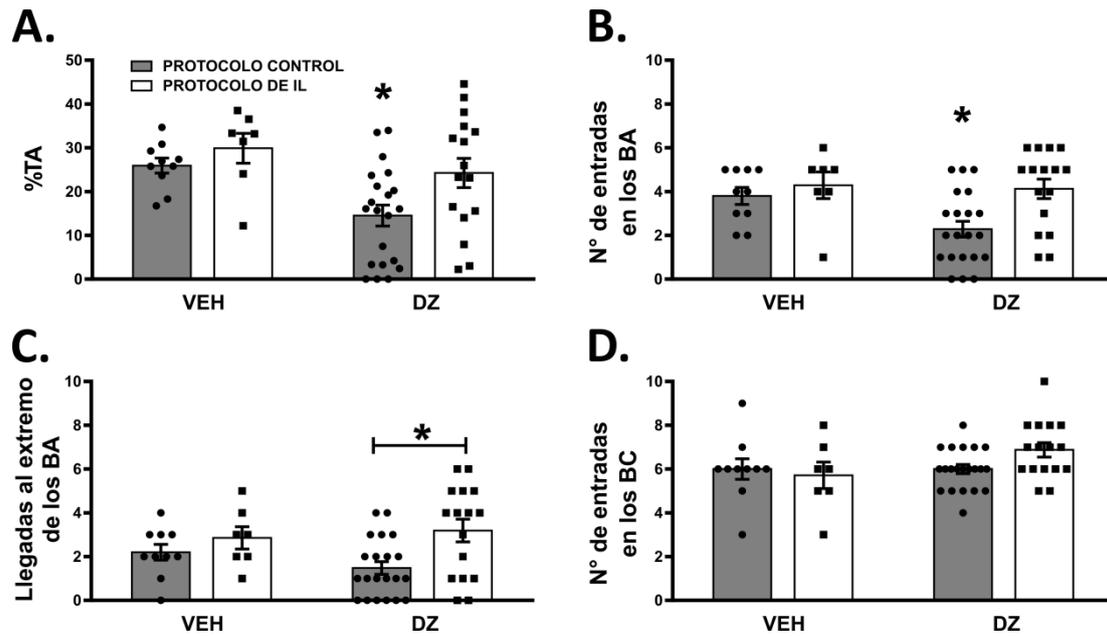


Figura 10: Resultados conductuales del LCE 48 horas después de la última administración de DZ. Los gráficos de barras que representan la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestran: **A)** Porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA) de los animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de IL y control (* $p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **B)** Número de entradas en los brazos abiertos (BA) de los animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de IL y control (* $p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **C)** Número de llegadas a los extremos de los brazos abiertos (BA) de los animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de IL y control (* $p < 0,05$ entre IL-DZ y C-DZ). **D)** Número de entradas en los brazos cerrados (BC) de los animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de IL y control. El número de valores analizados para cada gráfico fue de: Protocolo Control (VEH $n=10$; DZ $n=21$), Protocolo de Inhibición Latente (VEH $n=7$; DZ $n=16$).

Cuando se analizaron diferencialmente los animales tratados con DZ utilizando el protocolo control teniendo en cuenta el criterio de dependencia, es decir que mostraron un %TA menor o igual al 12% (ver métodos), se observó que el 38,1% cumplieron dicho criterio (DZ-D) mientras que el 61,9% de los animales expresaron un %TA mayor al 12% (DZ-ND; Tabla 1). Teniendo en cuenta este criterio de dependencia, el ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa en el %TA [$F_{(2, 28)} = 46,02$; $p = 0,0001$; Figura 11-A]. El análisis *a posteriori* mostró una disminución significativamente en el grupo DZ-D ($2,9 \pm 0,9$) cuando se comparó con los grupos VEH ($25,9 \pm 1,7$; * $p < 0,05$) y DZ-ND ($21,9 \pm 1,8$; * $p < 0,05$). No se observaron diferencias entre los grupos DZ-ND y VEH ($p > 0,05$). En el número de entradas en los BA se observó un efecto significativo entre los grupos [$F_{(2, 28)} = 17,22$; $p = 0,0001$; Figura 11-B]. La

comparación de las medias con el test *Newman–Keuls* evidenció una reducción significativa en el número de entradas en los BA en el grupo DZ-D ($0,75 \pm 0,25$) cuando se comparó con los grupos VEH ($3,8 \pm 0,39$, $*p < 0,05$) y DZ-ND ($3,23 \pm 0,36$, $*p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre DZ-ND y VEH ($p > 0,05$). También se observó un efecto significativo en la llegada a los extremos de los BA [$F_{(2,28)} = 11,74$; $p = 0,0002$; Figura 11-C], el análisis *a posteriori* demostró una disminución significativa en el grupo DZ-D ($0,25 \pm 0,16$) cuando se lo comparó con los grupos VEH ($2,2 \pm 0,36$, $*p < 0,05$) y DZ-ND ($2,23 \pm 0,3$, $*p < 0,05$). No se encontraron diferencias entre los grupos DZ-ND y VEH ($p > 0,05$). Cuando se analizó el número de entradas en los BC, el ANOVA de una vía, no mostró diferencias entre los grupos [$F_{(2,28)} = 0,7$; $p = 0,5035$; Figura 11-D].

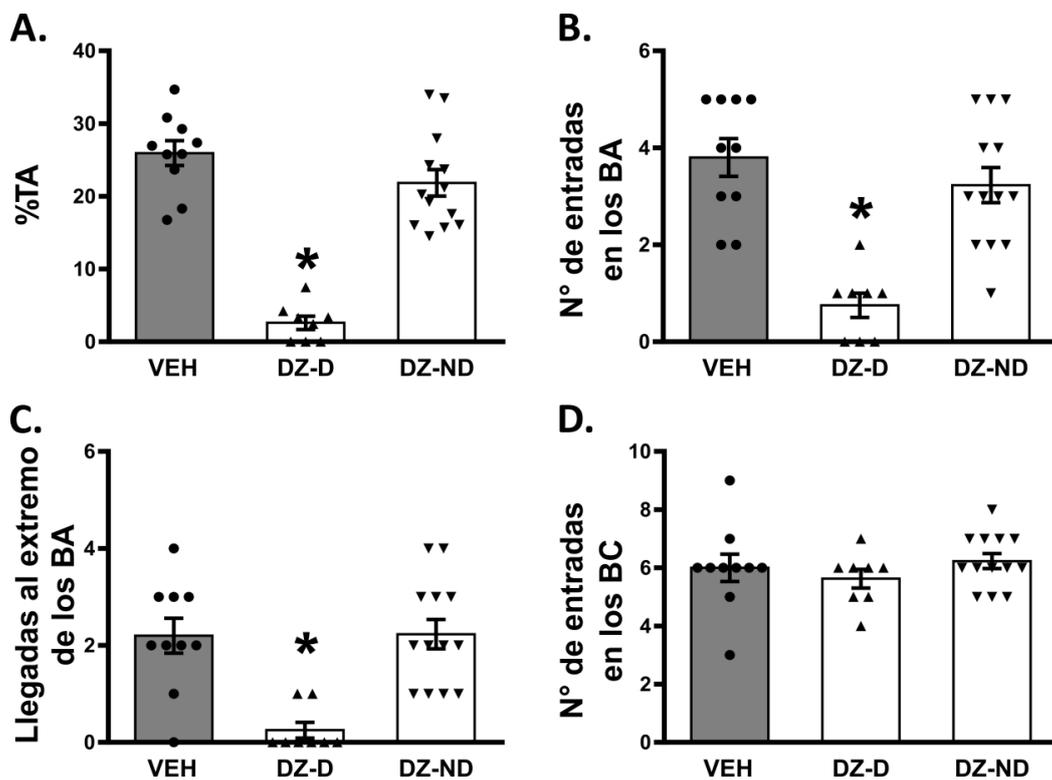


Figura 11: Resultados conductuales del LCE 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. Los gráficos de barras que representan la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestran: **A)** Porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND ($*p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **B)** Número de entradas en los brazos abiertos (BA) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND ($*p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **C)** Número de llegadas a los extremos de los brazos abiertos (BA) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND ($*p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **D)** Número de entradas en los brazos cerrados (BC) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND. El número de valores analizados para cada gráfico fue de: VEH ($n=10$), DZ-D($n=8$), DZ-ND $n=13$).

Cuando se analizaron diferencialmente los animales tratados con DZ utilizando el protocolo IL, teniendo en cuenta el criterio de dependencia, en este caso se observó que el 18,75% de los animales expresaron dependencia (DZ-D) mientras que el 81,25% pertenecieron al grupo DZ-ND (Tabla 1). El análisis poblacional (chi-cuadrado) no mostró una asociación entre el tratamiento (control o IL) y el número de ratas de cada condición (DZ-D y DZ-ND) [$X^2_{(0,95)}=1,63$, $df=1$; $p=0,2022$].

PROTOCOLO	DZ-D (%)	DZ-ND (%)
CONTROL	38,1	61,9
INHIBICIÓN LATENTE	18,75	81,25

Tabla 1: Distribución de animales dependientes y no dependientes expuestos a distintos protocolos de administración de diazepam ($p > 0,05$).

En los animales sometidos al protocolo de IL teniendo en cuenta el criterio de dependencia, el ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa en el %TA [$F_{(2, 20)}=9,47$; $p=0,0013$; Figura 12-A]. El análisis *a posteriori* mostró una disminución significativa en el grupo DZ-D ($4,4 \pm 1,78$) cuando se comparó con los grupos VEH ($29,89 \pm 3,42$; $*p < 0,05$) y DZ-ND ($28,83 \pm 2,76$; $*p < 0,05$). No se observaron diferencias entre los grupos DZ-ND y VEH ($p > 0,05$). Cuando el número de entrada en los BA fue analizado (Figura 12-B), se observó un efecto significativo entre los grupos [$F_{(2,20)}=8,4$; $p=0,0022$]. La comparación de las medias con el test *Newman-Keuls* evidenció una reducción significativa en el número de entradas en los BA en el grupo DZ-D ($1,33 \pm 0,33$) cuando se comparó con los grupos VEH ($4,28 \pm 0,61$; $*p < 0,05$) y DZ-ND ($4,77 \pm 0,34$; $*p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre DZ-ND y VEH ($p > 0,05$). También se observó un efecto significativo en la llegada a los extremos de los BA [$F_{(2,20)}=6,77$; $p=0,0057$; Figura 12-C], el análisis *a posteriori* demostró una disminución significativa de las llegadas a los extremos en el grupo DZ-D ($0,33 \pm 0,33$) cuando se lo comparó con los grupos VEH ($2,86 \pm 0,51$) y DZ-ND ($3,85 \pm 0,46$; $*p < 0,05$). No se encontraron diferencias entre los grupos DZ-ND y VEH ($p > 0,05$). Por otro lado, el ANOVA

de una vía, no mostró diferencias en el número de entrada en los BC entre los grupos [$F_{(2,20)}=1,61$; $p=0,2248$; Figura 12-D].

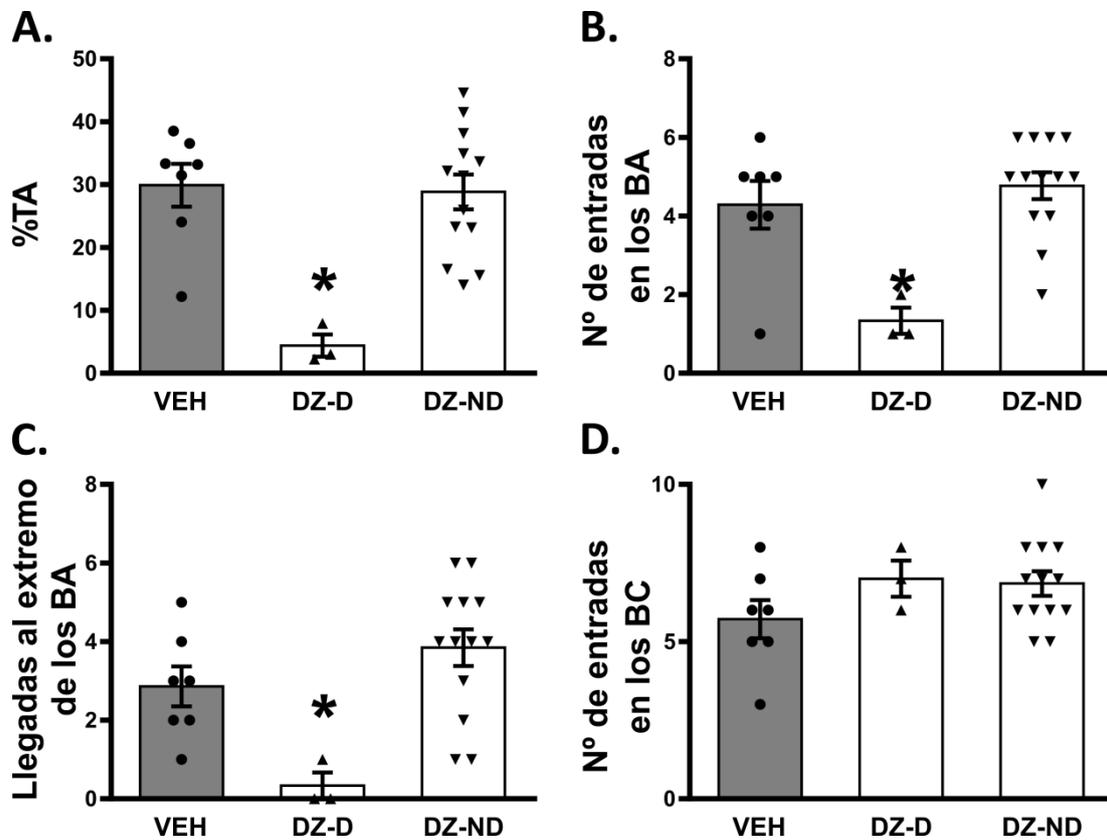


Figura 12: Resultados conductuales del LCE 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo de Inhibición Latente. Los gráficos de barras que representan la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestran: **A)** Porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND (* $p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **B)** Número de entradas en los brazos abiertos (BA) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND (* $p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **C)** Número de llegadas a los extremos de los brazos abiertos (BA) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND (* $p < 0,05$ comparado con todos los grupos). **D)** Número de entradas en los brazos cerrados (BC) de los grupos VEH, DZ-D y DZ-ND. El número de valores analizados para cada gráfico fue de: VEH ($n=7$), DZ-D ($n=3$), DZ-ND $n=13$).

Con el objetivo de evaluar si la administración repetida de DZ altera la actividad locomotora espontánea que puede llevar a una interpretación incorrecta del comportamiento de “tipo ansioso” testado en el LCE, se realizó el test de campo abierto en un grupo diferente de animales utilizando el protocolo control. El t-test no apareado no mostró diferencias significativas entre los grupos analizados [$t_{(16, 0,05)}=0,39$; $p=0,6957$; Figura 13]. Esto sugiere

que las diferencias conductuales que se observaron en los distintos grupos experimentales en el LCE, no son debidas a una alteración de la actividad locomotora de los animales.

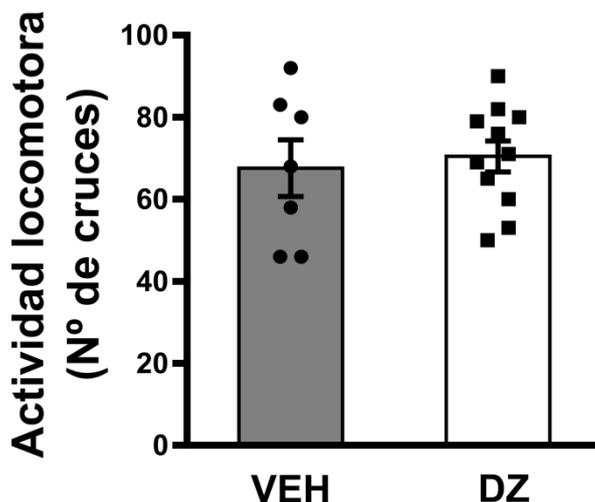


Figura 13: Resultados conductuales del test de campo abierto 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. El gráfico de barra que representa la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestra la actividad locomotora de los grupos VEH ($n=7$) y DZ ($n=11$).

CONCLUSIONES PARCIALES:

Los resultados obtenidos en este capítulo confirman resultados previos, donde se demostró que el desarrollo de dependencia a DZ es un proceso de aprendizaje de tipo asociativo, el cual puede ser interrumpido con la pre-exposición al contexto de administración que formó parte durante el tratamiento crónico a DZ, los últimos 5 días del tratamiento. Por lo tanto se demostró que el protocolo de IL fue eficaz para prevenir la expresión de la abstinencia a DZ, ya que el incremento del comportamiento de “tipo ansioso” evidenciado en el LCE con el tratamiento control no se observó cuando los animales recibieron DZ con el protocolo de IL.

Cuando se analizó la distribución poblacional de animales entre los protocolos de administración de DZ, si bien el chi-cuadrado no mostró una diferencia significativa entre los porcentajes de animales DZ-D y DZ-ND, se observó una tendencia al aumento de animales no dependientes cuando se utilizó el protocolo de IL ya que el 81,25% de los animales que recibieron DZ no

evidenciaron un incremento de “ansiedad”, mientras que con el protocolo control el 61,9% de los animales no expresaron “ansiedad” luego de la discontinuación de la administración de DZ. Este cambio en los porcentajes de animales DZ-ND podría explicar la eficacia del protocolo de IL para prevenir la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ. Por lo tanto la diferenciación conductual entre animales dependientes y no dependientes permitió abordar en los próximos capítulos el estudio de posibles mecanismos que subyacen al desarrollo y/o expresión de dependencia a DZ.

Por último es importante destacar que la diferenciación conductual entre animales DZ-D y DZ-ND reproducen reportes en humanos en relación a la expresión de la abstinencia a DZ, ya que la dependencia es un fenómeno que presenta una notable variabilidad inter-individual y la intensidad de la necesidad o compulsión por consumir varía entre las diversas personas. En el caso de las BZDs, aproximadamente el 35% de los pacientes tratados durante más de 4 semanas desarrollan dependencia, y cuanto mayores hayan sido las dosis utilizadas y más prolongado el tratamiento, más intenso es el síndrome de abstinencia (Hurlé *et al.*, 2008).

OBJETIVO II

OBJETIVO II

Caracterizar el impacto de la interferencia cognitiva en las variaciones de la excitabilidad neuronal descritas en el HP luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ.

ANTECEDENTES:

Como se ha descrito en esta tesis y en trabajos anteriores, el desarrollo de dependencia a DZ por la administración crónica subyace a procesos de aprendizaje asociativo y memoria (Perez *et al.*, 2002; Monti *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2012), donde el HP tiene un rol esencial (Ramirez & Perez, 2009), ya que participa en el procesamiento de las asociaciones entre el contexto ambiental y los estímulos no condicionados, como los efectos de las drogas de abuso (Kim & Fanselow, 1992). Numerosos trabajos indican que la adicción a drogas y los procesos de aprendizaje y memoria, comparten circuitos neuronales, cascadas de señales intracelulares (Nestler, 2001; Wolf, 2002; Kelley, 2004) y están acompañados por alteraciones en la plasticidad sináptica, particularmente en las sinapsis glutamatérgicas del cerebro, siendo el LTP un claro ejemplo de estas adaptaciones (Nestler, 2002).

Estudios previos demostraron un aumento en la plasticidad sináptica en el GD del HP, evidenciado como una reducción en el umbral para generar LTP, en animales que expresaron un incremento de “ansiedad” en el LCE luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ (Perez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002; Monti *et al.*, 2010; Monti *et al.*, 2012). Resultados similares se encontraron luego del desarrollo de tolerancia al efecto sedante de DZ, ya que los animales tolerantes a dicho efecto mostraron una reducción en el umbral para generar LTP. Sin embargo, cuando se utilizó el paradigma de IL para impedir el desarrollo de tolerancia al efecto hipo-locomotor de DZ (Marin *et al.*, 1999) se observó una normalización del umbral para generar LTP.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este capítulo nos propusimos estudiar si la interferencia cognitiva (IL) durante el desarrollo de dependencia a DZ es capaz de normalizar el umbral para generar LTP luego de la discontinuación del tratamiento con DZ.

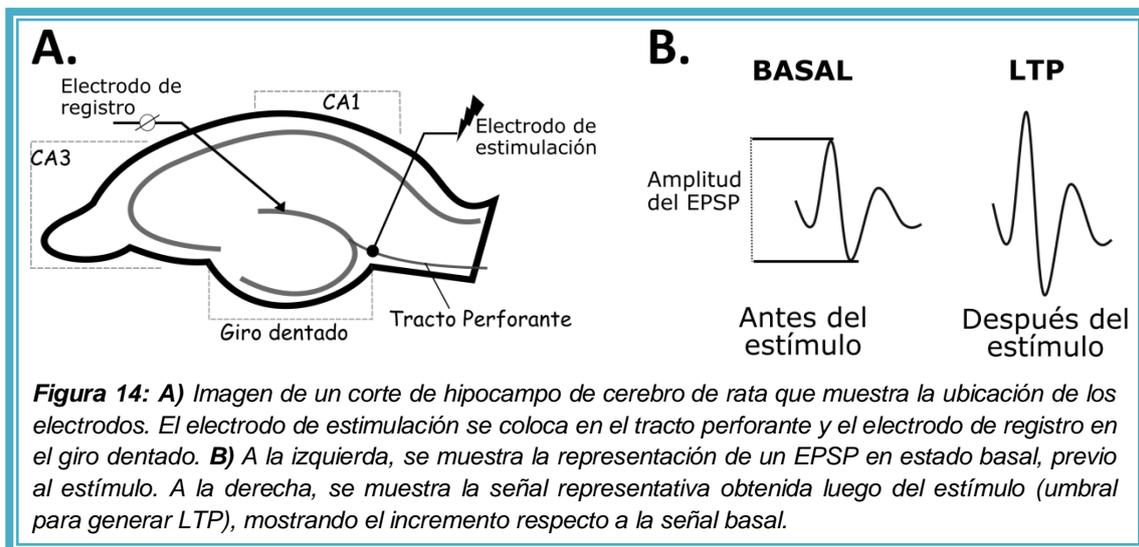
MÉTODOS:Protocolos de administración:

Los animales recibieron DZ y VEH utilizando el *protocolo control* y el *protocolo de IL*, tal como se detalló en el Objetivo I.

Electrofisiología:

Inmediatamente después de del test conductual (LCE) los animales fueron sacrificados, utilizando una guillotina, para realizar registros electrofisiológicos extracelulares multiunitarios. Con el objetivo de evitar variaciones provocadas por el ritmo circadiano o factores de estrés no específicos, las ratas fueron sacrificadas entre las 11:00 y 12:00 am. (Teyler & DiScenna, 1987). Para ello se prepararon cortes transversales del HP de aproximadamente 400 μm de espesor, los cuales fueron mantenidos en condiciones fisiológicas en una cámara de almacenamiento que contiene solución de Krebs estándar (NaCl, 124,3 mM; KCl, 4,9 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mM; H_2KPO_4 , 1,25 mM; HNaCO_3 , 25,6 mM; glucosa, 10,4 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,3 mM; Sigma, Argentina) saturada con 95% de O_2 y 5% CO_2 . Al comienzo de los experimentos, cada rebanada se colocó en una cámara de registro (BSC-BU Harvard Apparatus) perfundida con la solución estándar de Krebs saturada con 95% de O_2 y 5% CO_2 . La velocidad de perfusión fue de 1,6 ml/min, y la temperatura de la solución del baño se mantuvo a 28 °C con un controlador de temperatura (TC-202A Harvard Aparatos). Los potenciales de campo post-sinápticos excitatorios (EPSP -del inglés- Excitatory Post Synaptic Potentials) fueron evocados con un electrodo de estimulación colocado en el tracto perforante y conectado a un generador de pulsos (A310 Accupulser-World Precision Instruments Inc., EE.UU.). El electrodo de registro fue colocado en la capa de células granulares del GD, y conectado a un amplificador que envió las señales a un osciloscopio donde se observaron y registraron los EPSP generados (Figura 14-A). Sólo los cortes que mostraron una respuesta estable fueron incluidos. La amplitud (mV) de los EPSP que respondieron a pulsos de 0,2 Hz (0,5 ms; 10 mA cada uno) fueron medidos cada 5 min durante un período de 20 a 30 min de tiempo (registro basal). Una vez que no se observaron cambios en la amplitud del EPSP, se aplicó un “*protocolo de estimulación de frecuencia creciente*”. Este protocolo permitió analizar distintos

valores de frecuencia de estimulación con el fin de determinar el menor estímulo para generar LTP, “valor umbral”. El estímulo (“*tétano*”) consistió en un tren de pulsos cuadrados de 2 segundos de duración (0,5 ms; 10 mA cada uno), utilizando una frecuencia de estimulación creciente, comenzando con un estímulo de 5 Hz, si no se observó LTP 20 min después de la estimulación, otra rebanada del HP se utilizó para probar un estímulo al siguiente valor de frecuencia pudiendo llegar hasta 200 Hz (Perez *et al.*, 2010). Una vez que se generó el LTP, ningún otro estímulo fue otorgado y se continuó registrando el EPSP a 0,2 Hz cada 20 minutos para realizar un perfil temporal del LTP. Se considera que se generó el LTP cuando se produce un aumento superior al 30% de algún parámetro del EPSP con respecto al registro basal, y que el incremento persista durante 60 minutos (Figura 14-B). Se determinó la frecuencia (Hz) umbral para generar el LTP en los distintos grupos experimentales, los valores se analizaron mediante un ANOVA de dos vías y se expresaron como la media (Hz) \pm SEM. El porcentaje de aumento del EPSP con respecto al registro basal se promedió en cada punto de tiempo y se analizó mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, considerando al tiempo de cada registro como la medida repetida.



RESULTADOS:

La inhibición latente previene el aumento de la plasticidad sináptica hipocampal observada durante la abstinencia a DZ en animales “dependientes”.

El ANOVA de dos vías mostró en el umbral para generar LTP, un efecto significativo del tratamiento [$F_{(1, 17)}=13,65$; $p=0,0018$] y de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 17)}=5,08$; $p=0,0378$], sin efecto del protocolo [$F_{(1, 17)}=0,98$; $p=0,3354$; Figura 15-A]. El análisis a *posteriori*, indicó que en el protocolo control el umbral para generar LTP fue significativamente menor en C-DZ (52 ± 8 Hz) cuando se comparó con C-VEH ($96,0 \pm 7,48$ Hz; $*p<0,05$); mientras que en el protocolo de IL no se encontraron diferencias significativas entre los grupos LI-DZ ($76,0 \pm 9,79$ Hz) y LI-VEH ($86,67 \pm 4,22$ Hz; $p>0,05$). Además, se encontraron diferencias significativas entre C-DZ cuando se comparó con los grupos C-VEH, LI-VEH y LI-DZ ($*p<0,05$), pero no se encontraron diferencias entre los grupos C-VEH, LI-VEH y LI-DZ ($p>0,05$). Estos resultados obtenidos utilizando el protocolo control fueron capaces de reproducir los resultados previos del grupo de investigación mencionados, en los que se reportó una reducción en el umbral para generar LTP en el HP en animales que expresaron “ansiedad” durante la abstinencia a DZ (Perez *et al.*, 2002).

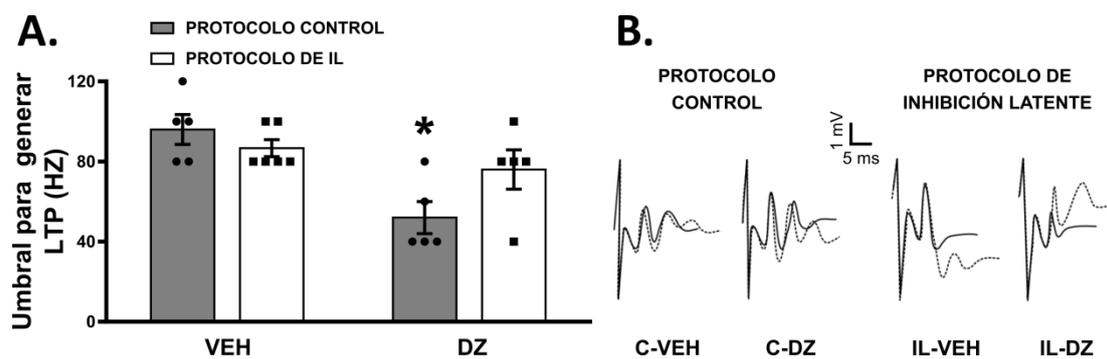


Figura 15: Resultados de electrofisiología 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control y de inhibición latente. A) Los gráficos de barras que representan la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestran, el umbral para generar LTP (HZ) de los grupos C-VEH ($n=5$), C-DZ ($n=5$), IL-VEH ($n=6$), IL-DZ ($n=5$), $*p<0,05$ comparado con todos los grupos. B) Trazos representativos de los EPSP correspondientes a los grupos C-VEH, C-DZ, IL-VEH, IL-DZ antes (línea continua) y después (línea de puntos) del estímulo.

Cuando se analizó el perfil temporal del mantenimiento del LTP, el ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo [$F_{(5, 85)}=42,2$; $p=0,0001$], sin efecto de la interacción grupo x tiempo [$F_{(15, 85)}=0,4$; $p=0,9763$] ni de los grupos [$F_{(3, 17)}=0,18$; $p=0,9055$; Figura 16]. El test *a posteriori* reveló diferencias significativas en el porcentaje de incremento del EPSP comparado con la línea base entre los tiempos anteriores al *tétano* (-40 y -20 minutos) y los tiempos posteriores al mismo (0, 20, 40 y 60 minutos, $*p<0,05$). No se encontraron diferencias entre los grupos en los tiempos 0, 20, 40 y 60 minutos ($p>0,05$). Esto sugiere que la determinación del umbral para generar LTP es un método más sensible para evidenciar un cambio en la excitabilidad neuronal comparado con el nivel de potenciación (incremento del EPSP) luego de un *tétano*.

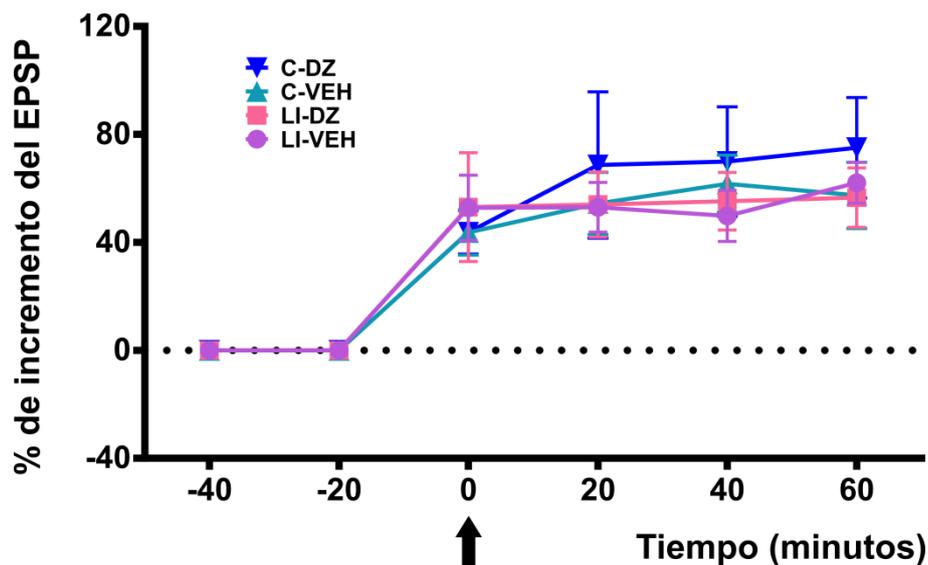


Figura 16: Perfil temporal del mantenimiento del LTP. El gráfico muestra el porcentaje de incremento del EPSP luego de un estímulo efectivo, en los grupos C-VEH ($n=5$), C-DZ ($n=5$), IL-VEH ($n=6$), IL-DZ ($n=5$); $*p<0,05$ con respecto a los tiempos -40 y -20 minutos. Los símbolos representan las medias \pm SEM. La flecha negra representa el momento en que se aplicó el estímulo.

CONCLUSIONES PARCIALES:

Estos resultados confirman reportes previos que indican una facilitación del proceso plástico hipocampal, medido como una disminución en el umbral para generar LTP, sin afectar el nivel de potenciación, en aquellos animales que evidenciaron dependencia luego de la administración crónica de DZ. Sin embargo, los animales que recibieron DZ con el protocolo de IL, en los cuales no se observó la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ, no evidenciaron un cambio en la plasticidad sináptica hipocampal, ya que el umbral para generar LTP es comparable con el grupo vehículo.

Por lo tanto, si el desarrollo de dependencia a DZ es un fenómeno de aprendizaje asociativo, y las señales ambientales son relevantes, entonces nuestros resultados con respecto a la ausencia de un incremento del comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ y la falta del aumento concomitante en la plasticidad sináptica del HP, observada en animales después de la pre-exposición al contexto de administración (IL), indicarían que la plasticidad sináptica en el HP sería el mecanismo biológico de los cambios estructurales y neuroquímicos que se producen durante el proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia a DZ.

OBJETIVO III

OBJETIVO III

Caracterizar la participación del ON luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ, determinando si la interferencia cognitiva afecta la expresión de NOS-1 en el HP.

ANTECEDENTES:

El ON es un neuromodulador gaseoso sintetizado en el cerebro principalmente por la enzima NOS-1 luego de la activación del receptor glutamatérgico NMDA (Garthwaite & Boulton, 1995). Se ha demostrado que el ON cumple un rol fundamental en procesos de aprendizaje y memoria (Park *et al.*, 1998) y en el mantenimiento del LTP en el HP (Bon & Garthwaite, 2003), ya que modula procesos de excitabilidad neuronal y de plasticidad sináptica dentro del HP y también en otras áreas del cerebro (Prast & Philippu, 2001).

Por otra parte, la activación de las vías nitrérgicas contribuyen a las adaptaciones neuronales inducidas por diferentes drogas adictivas (Tayfun Uzbay & Oglesby, 2001; Nasif *et al.*, 2011; Gabach *et al.*, 2013), y la inhibición de la síntesis de ON reduce la expresión del síndrome de abstinencia de psicoestimulantes (Rawls *et al.*, 2006), nicotina (Jain *et al.*, 2008), opioides (Vaupel *et al.*, 1995), etanol (Uzbay *et al.*, 1997), y BZDs (Talarek *et al.*, 2011). Por lo tanto en este capítulo se evaluó si la administración repetida de DZ o la manipulación comportamental (IL) fueron capaces de inducir cambios en la expresión de la enzima NOS-1 luego de la interrupción de la administración crónica de DZ, y así estudiar el rol del ON en los procesos de plasticidad sináptica y de aprendizaje asociativos que subyacen al desarrollo de dependencia a DZ.

MÉTODOS:

Protocolos de administración:

Los animales recibieron DZ y VEH utilizando el *protocolo control* y el *protocolo de IL*, descritos en el Objetivo I.

Procedimiento de Western Blot:

Inmediatamente después del test conductual (LCE) los animales provenientes de cada grupo experimental fueron decapitados con guillotina. Sus cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en hielo. Se prepararon cortes coronales de cerebro de 2 mm que contenían HP dorsal (HPd) o ventral (HPv). El tejido se homogeneizó en un buffer de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas, el homogenato se centrifugó a 12000g durante 10min a 4°C. El sobrenadante se combinó con buffer de muestra (LAEMMLI), luego fue hervido a 100°C durante 5min y almacenado a -20°C hasta su uso. La determinación del contenido de proteínas se realizó utilizando alícuotas del sobrenadante mediante el método de Bradford. Las muestras (70 µg de proteínas) fueron corridas en un gel de electroforesis de poliacrilamida sodio-dodecyl sulfato al 8% (SDS-PAGE), transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno en un buffer de tris-glicina con metanol al 20%. Las membranas fueron cortadas a 75KDa con el objetivo de incubar los anticuerpos para NOS-1 (160KDa) y actina (43KDa). Los anticuerpos primarios fueron incubados durante la noche a 4°C, NOS-1 (1:500; *Cell Signaling Technology, Cat #4234*), y actina (1:1000; *Santa Cruz Biotechnology, INC. Cat# sc-1616*). Al día siguiente las membranas fueron incubadas con su correspondiente anticuerpo secundario, anti-rabbit (1:20000; *IRDye 800 wc*) y anti-goat (1:20000; *IRDye 680 LD*) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron escaneadas (Odyssey CLx, LI-COR) y el valor de densidad óptica (DO) de cada banda fue cuantificado con un programa de análisis de imágenes (GelPro32 Analyzer). La expresión de actina fue utilizada como un control interno y los resultados se expresaron como la media de la DO de NOS-1/ DO de actina.

RESULTADOS:

La inhibición latente modifica la expresión de NOS-1 hipocampal durante la abstinencia a DZ.

Cuando se analizaron los niveles de proteína NOS-1 en el HP dorsal, el ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 21)}=8,29$; $p=0,009$], del tratamiento [$F_{(1, 21)}=5,59$; $p=0,0278$] y del

protocolo [$F_{(1, 21)}=6,86$; $p=0,0161$; Figura 17-A y B]. El análisis *Newman-Keuls* mostró que en el protocolo de IL la expresión de NOS-1 fue significativamente menor en IL-DZ ($0,33 \pm 0,08$ OD) cuando se comparó con IL-VEH ($0,87 \pm 0,15$ OD; $*p<0,05$), mientras que en el protocolo control no se encontraron diferencias entre C-DZ ($0,9 \pm 0,1$ OD) y C-VEH ($0,85 \pm 0,06$ OD; $p>0,05$). También se observaron diferencias significativas entre los grupos C-DZ e IL-DZ ($*p<0,05$), y no se encontraron diferencias entre los grupos IL-VEH, C-VEH y C-DZ ($p>0,05$). Además, cuando se analizó la relación entre los niveles de proteína NOS-1 y la performance conductual de los mismos animales (%TA) en el grupo C-DZ, se observó una correlación negativa y estadísticamente significativa [Correlación de Pearson: $r=-0,87$; $p=0,0048$; Figura 17-C], sin embargo en el grupo IL-DZ no se observó una correlación entre los parámetros analizados [Correlación de Pearson: $r=-0,63$; $p=0,2569$; Figura 17-D].

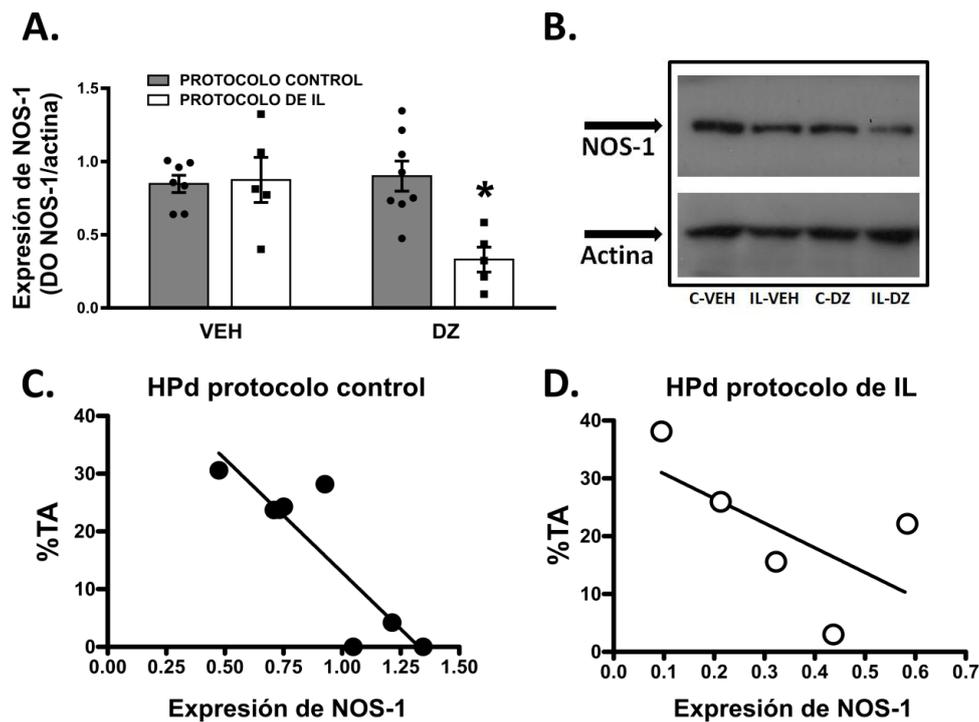


Figura 17: Expresión de NOS-1 en el hipocampo dorsal (HPd) 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control y de inhibición latente. **A)** El gráfico de barras que representa la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestra, la expresión de NOS-1, cuantificada como la densidad óptica (DO) de NOS-1/ DO de actina, en los grupos C-VEH ($n=7$), C-DZ ($n=8$), IL-VEH ($n=5$), IL-DZ ($n=5$), $*p<0,05$ comparado con todos los grupos. **B)** Imágenes representativas de las membranas de western-blot. **C)** Correlación entre el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA) y la expresión de NOS-1 en el HPd, en animales que fueron administrados con DZ utilizando el protocolo control. **D)** Correlación entre el %TA y la expresión de NOS-1 en el HPd, en animales que fueron administrados con DZ utilizando el protocolo de IL.

Por otro lado, cuando se analizaron los niveles de proteína NOS-1 en el HPv, el ANOVA de dos vías no mostró un efecto significativo de la interacción tratamiento x protocolo [$F_{(1, 20)} = 2,7$; $p = 0,1159$], del tratamiento [$F_{(1, 20)} = 0,56$; $p = 0,4639$], ni del protocolo [$F_{(1, 20)} = 0,44$; $p = 0,5159$; Figura 18-A y B]. El análisis de la relación entre los niveles de proteína NOS-1 y el %TA, no evidenció una correlación estadísticamente significativa en el grupo C-DZ [Correlación de Pearson: $r = -0,11$; $p = 0,7975$; Figura 18-C], ni en el grupo IL-DZ [Correlación de Pearson: $r = -0,78$; $p = 0,1217$; Figura 18-D].

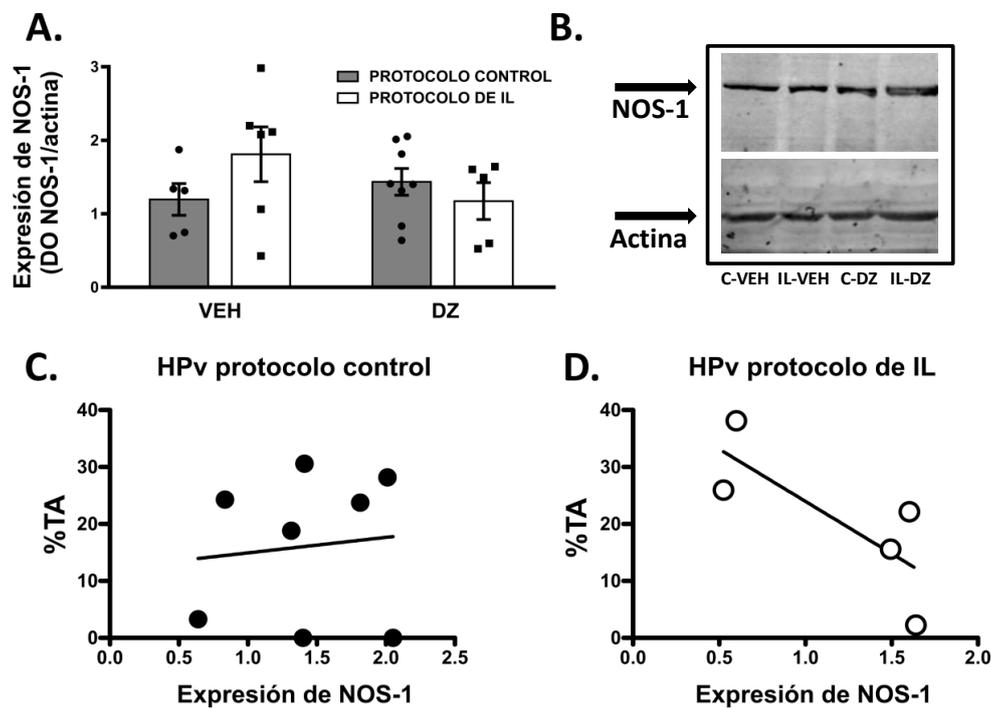


Figura 18: Expresión de NOS-1 en hipocampo ventral (Hvd) 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control y de inhibición latente. **A)** El gráfico de barras que representa la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestra, la expresión de NOS-1, cuantificada como la densidad óptica (DO) de NOS-1/ DO de actina, en los grupos C-VEH ($n=5$), C-DZ ($n=8$), IL-VEH ($n=6$), IL-DZ ($n=5$). **B)** Imágenes representativas de las membranas de western-blot. **C)** Correlación entre el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA) y la expresión de NOS-1 en el HPv, en animales que fueron administrados con DZ utilizando el protocolo control. **D)** Correlación entre el %TA y la expresión de NOS-1 en el HPv, en animales que fueron administrados con DZ utilizando el protocolo de IL.

CONCLUSIONES PARCIALES:

Con estos resultados se pone en evidencia la posible participación del ON en la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ, ya que se observó una disminución de la expresión de NOS-1 en aquellos animales que recibieron DZ con el protocolo de IL, pudiendo ser la expresión de esta proteína un mecanismo compensatorio para reducir la plasticidad sináptica hipocampal y evitar el aumento del comportamiento ansioso característico del síndrome de abstinencia.

Por otro lado, si bien el grupo que recibió DZ con el protocolo control mostró niveles de proteína NOS-1 similares al grupo VEH en el HPd durante la abstinencia a DZ, cuando se analizaron individualmente los parámetros de cada animal se observó una correlación negativa entre los niveles de ansiedad y de proteína, es decir que los animales “ansiosos” presentaron una elevada expresión de NOS-1 mientras que animales no ansiosos mostraron una disminución en la expresión de la enzima. Sin embargo, cuando este análisis se realizó en el protocolo de IL no se encontró una correlación entre dichos parámetros, reforzando el efecto del tratamiento cognitivo sobre la expresión de la enzima. Es decir que la IL estaría interfiriendo con el proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia, y la vía del ON podría ser un mecanismo molecular que acompañe a este fenómeno ya que esta manipulación cognitiva tiene un efecto directo sobre la expresión de la enzima.

Por último es importante señalar que la reducción en los niveles de proteína NOS-1, cuando se realizó la interferencia del aprendizaje (IL), solo se observó en el HPd, una región involucrada principalmente en el proceso cognitivo de aprendizaje y memoria (Fanselow & Dong, 2010). Sin embargo, no es posible descartar que el protocolo de IL sea capaz de inducir cambios en la transmisión sináptica, o en los niveles de NOS-1, incluyendo alguna de sus tres variantes α , β o γ , en otras estructuras cerebrales que puedan explicar también su participación en la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ.

OBJETIVO IV

OBJETIVO IV

Determinar si la inhibición farmacológica de NOS-1 desencadena los cambios comportamentales y electrofisiológicos observados con la interferencia cognitiva.

ANTECEDENTES:

Como se mencionó en el capítulo anterior, se ha demostrado que el ON participa en la expresión del síndrome de abstinencia a diversas drogas. En relación a las BZDs, se sabe que la administración aguda de inhibidores no selectivos de NOS atenúa algunos de los signos del síndrome de abstinencia en ratas y ratones, tales como las convulsiones inducidas por pentilenetetrazol, la hiperlocomoción y la disminución de peso corporal (Talarek *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y los resultados anteriores de esta tesis, en los que evidenciamos un cambio en la expresión de la enzima NOS-1 luego de un tratamiento crónico con DZ (Objetivo III), en este capítulo nos propusimos demostrar la participación del ON durante el desarrollo de dependencia a DZ y en los cambios plásticos observados durante la abstinencia a DZ, a través de la inhibición farmacológica de la enzima NOS-1 durante el desarrollo de dependencia.

MÉTODOS:

Protocolo de administración:

Protocolo con 7-NI:

Los animales recibieron dos inyecciones (i.p.) simultáneas durante 18 días (Figura 19). Los primeros 13 días, recibieron una inyección sin solución (solo pinchazo, simulación de administración) y la otra inyección con DZ o VEH. Durante los últimos 5 días del tratamiento se les administró de forma simultánea DZ o VEH y 7-Nitroindazole (7-NI, 50mg/kg). Obteniendo los siguientes grupos experimentales: DZ/7-NI; VEH/7-NI.



Figura 19: Esquema que muestra el diseño experimental utilizado para el protocolo con 7-Nitroindazole (7-NI). LCE (laberinto en cruz elevado).

Electrofisiología:

Inmediatamente después del test conductual (LCE) los animales fueron sacrificados para realizar registros electrofisiológicos extracelulares multiunitarios como se describió en el objetivo II (Página 56).

RESULTADOS:

La inhibición farmacológica de NOS-1 previene la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ y el aumento en la plasticidad sináptica hipocampal asociada.

Estos resultados mostraron que la inhibición farmacológica de NOS-1 durante la administración crónica de DZ fue capaz de prevenir la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ, ya que el análisis del *t-test* no apareado no arrojó diferencias significativas en el %TA [$t_{(32, 0,05)} = 0,12$; $p=0,9053$; Figura 20-A] entre los grupos VEH/7-NI ($31,07 \pm 2,04$) y DZ/7-NI ($30,45 \pm 3,19$), ni en ninguno de los otros parámetros analizados en el LCE; número de entrada en los BA [$t_{(32, 0,05)} = 0,45$; $p=0,6527$; Figura 20-B] VEH/7-NI ($4,3 \pm 0,42$) comparado con DZ/7-NI ($4,04 \pm 0,32$), llegadas a los extremos de los BA [$t_{(32, 0,05)} = 1,61$; $p=0,1182$; Figura 20-C] VEH/7-NI ($3,3 \pm 0,5$) comparado con DZ/7-NI ($2,46 \pm 0,27$), y número de entrada en los BC [$t_{(32, 0,05)} = 0,21$; $p=0,8335$; Figura 20-D], VEH/7-NI ($5,7 \pm 0,34$) comparado con DZ/7-NI ($5,83 \pm 0,38$).

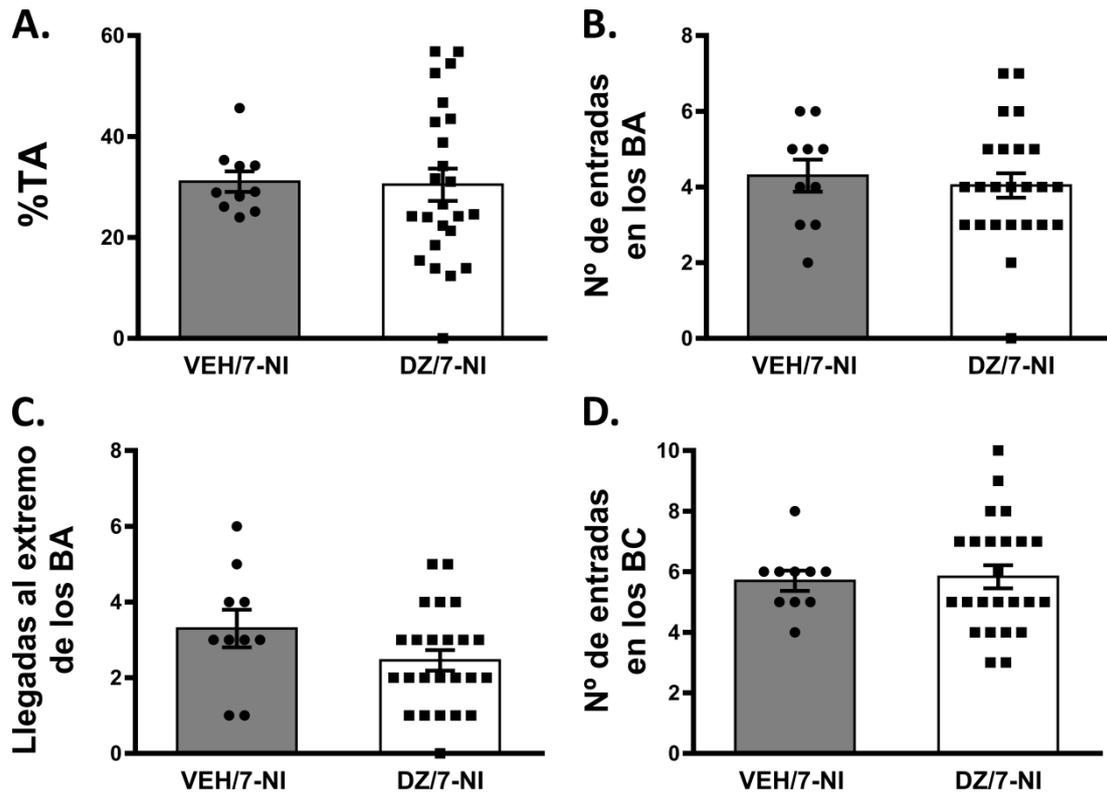


Figura 20: Resultados conductuales del LCE 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo con 7-NI. Los gráficos de barras que representan la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestran: **A)** Porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos (%TA) de animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de 7-NI. **B)** Número de entradas en los brazos abiertos (BA) de animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de 7-NI. **C)** Número de llegadas a los extremos de los brazos abiertos (BA) de animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de 7-NI. **D)** Número de entradas en los brazos cerrados (BC) de animales que recibieron VEH y DZ con el protocolo de 7-NI. El número de valores analizados para cada gráfico fue de: VEH/7-NI ($n=10$); DZ/7-NI ($n=24$).

Cuando se analizaron diferencialmente los animales que recibieron DZ utilizando el protocolo con 7-NI, teniendo en cuenta el criterio de dependencia, se observó que el 8,34% de los animales pertenecieron al grupo DZ-D, mientras que el 91,66% formaron parte del grupo DZ-ND (Tabla 2). El análisis poblacional entre los animales que recibieron DZ con el protocolo de 7-NI comparados con aquellos que lo recibieron con el protocolo control (ver objetivo I), mostró una asociación entre el protocolo utilizado (control o 7-NI) y el número de ratas de cada condición (DZ-D y DZ-ND) cuando se realizó el test Chi-cuadrado [$X^2_{(0,95)} = 4,15$, $df=1$; $p=0,0417$].

PROTOCOLO	DZ-D (%)	DZ-ND (%)
CONTROL	38,1	61,9
7-NI	8,34	91,66

Tabla 2: Distribución de animales dependientes y no dependientes expuestos a distintos protocolos de administración de diazepam ($p > 0,05$).

Por último se observó que la inhibición farmacológica de NOS-1 fue capaz de revertir el aumento en la plasticidad sináptica hipocampal asociada a la expresión de dependencia a DZ, ya que cuando se analizó el umbral para generar LTP no se encontraron diferencias entre el grupo VEH/7-NI ($96,0 \pm 7,48$) y el grupo DZ/7-NI ($76,0 \pm 11,66$), [$t_{(8, 0,05)} = 1,44$; $p = 0,1869$; Figura 21].

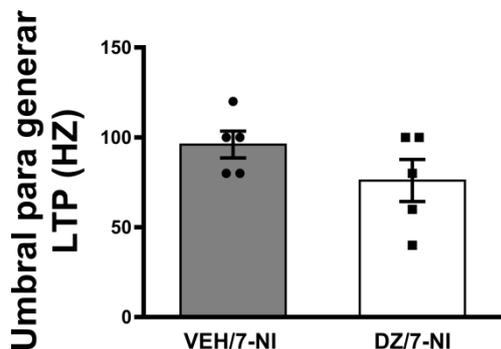


Figura 21: Resultados de electrofisiología 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo con 7-NI. El gráfico de barras que representa la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales, muestra el umbral para generar LTP (HZ) de los grupos VEH/7-NI ($n=5$) y DZ-D/7-NI ($n=5$).

CONCLUSIONES PARCIALES:

Con estos resultados se demuestra que el ON participa en el desarrollo de dependencia a DZ y en la plasticidad sináptica hipocampal que subyace a este fenómeno, ya que la inhibición sistémica de la enzima NOS-1 durante el tratamiento crónico con DZ fue capaz de evitar el incremento del índice de ansiedad en animales expuestos al LCE durante la abstinencia, y de reducir el porcentaje de animales dependientes (DZ-D; 8,34%). Además se observó que la efectividad de este tratamiento en prevenir la expresión de un

comportamiento de “tipo ansioso”, se asocia con la reversión del aumento en la plasticidad sináptica en el HP inducida por el tratamiento crónico con DZ.

En resumen, en este capítulo se demuestra que la inhibición farmacológica de la enzima NOS-1 durante el tratamiento crónico con DZ, fue capaz de desencadenar cambios conductuales y en la plasticidad sináptica en el HP similares a los observados previamente con el tratamiento cognitivo. Entonces el ON estaría modulando las neuroadaptaciones inducidas por la administración crónica de DZ, y la reducción de su disponibilidad, ya sea a través de la inhibición de NOS-1 o por medio de la IL, estaría disminuyendo en parte la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia.

OBJETIVO V

OBJETIVO V

Caracterizar los cambios en la plasticidad sináptica funcional y estructural, y en la neurotransmisión nitrérgica en el NAc, luego de la discontinuación de la administración crónica de DZ.

ANTECEDENTES:

El NAc desempeña un papel central en los circuitos neuronales que son responsables de comportamientos motivados, es decir, los tipos de comportamientos que subyacen a la búsqueda compulsiva de drogas (Wolf, 2002). La gran mayoría de las conexiones aferentes que recibe el NAc son glutamatérgicas, provenientes del HP, corteza pre-frontal y amígdala, que proporcionan la unidad excitadora necesaria para evocar el comportamiento. El NAc y el HP se regulan funcionalmente de forma bi-direccional, ya que el NAc está involucrado en la modulación de la plasticidad del HP (Lopez *et al.*, 2008), y el HP envía proyecciones hacia el NAc (Kelley & Domesick, 1982) que proporcionan información espacial y contextual acerca de diferentes estímulos (Brog *et al.*, 1993; Sesack & Grace, 2010).

Las células principales del NAc son las neuronas espinales medianas GABAérgicas (MSN; por sus siglas en inglés "Medium Spiny Neurons"), y constituyen aproximadamente el 90% – 95% de la población neuronal del NAc (Scofield *et al.*, 2016). El 5% -10% de las células del NAc que no son MSN se clasifican en términos generales como interneuronas, y se pueden codificar químicamente en varias clases por su perfil de expresión de proteínas (Kawaguchi *et al.*, 1995). Hay tres tipos discretos de interneuronas GABAérgicas en el cuerpo estriado: las que expresan parvalbúmina; aquellas que expresan calretinina; y aquellas que coexpresan somatostatina, neuropéptido-Y y NOS-1 (Tepper *et al.*, 2010). Estas últimas interneuronas constituyen menos del 1% de las neuronas en el NAc pero tienen importantes consecuencias en la mediación de la neurotransmisión excitadora (Scofield *et al.*, 2016), ya que se reportó que un aumento, in vivo, de la disponibilidad de ON en el NAc incrementa los disparos espontáneos de las MSN (West & Grace, 2004).

Teniendo en cuenta la participación del NAc en comportamientos que subyacen a la búsqueda de sustancias adictivas, en este último objetivo nos propusimos evaluar los posibles cambios inducidos durante la abstinencia a DZ, luego de su administración crónica, en la plasticidad celular de las MSN y en el sistema nitrérgico en el NAc.

MÉTODOS:

Protocolo de administración:

Los animales recibieron DZ y VEH utilizando el protocolo control.

Preparación del tejido:

Inmediatamente después del test conductual (LCE) los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (55mg/kg) – xilazina (11 mg/kg; Holliday-Scott, Beccar, Buenos Aires, Argentina) y perfundidos transcárdiacamente con un buffer de “líquido cefalorraquídeo artificial” (LCFa) bajo en calcio (NaCl 125mM, KCl 2,5mM, NaHCO₃ 25mM, MgCl₂ 3,5mM, CaCl₂ 0,5mM, y glucosa 25mM (pH 7,4; 310 mOsm/L, oxigenado con 95% de O₂ y 5% de CO₂, a temperatura ambiente) con el objetivo de eliminar restos de sangre y aumentar la sobrevivencia neuronal. Inmediatamente después los animales fueron decapitados para remover el cerebro y se realizaron cortes transversales de 300µm conteniendo el NAc con un vibratomo (Leica VT1000S, Bannockburn, IL) manteniendo el tejido en un buffer LCFa (NaCl 125mM, KCl 2,5mM, NaHCO₃ 25mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, y glucosa 25mM; pH 7,4; 310 mOsm/L, oxigenado con 95% de O₂ y 5% de CO₂, a temperatura ambiente).

Electrofisiología (Patch-clamp):

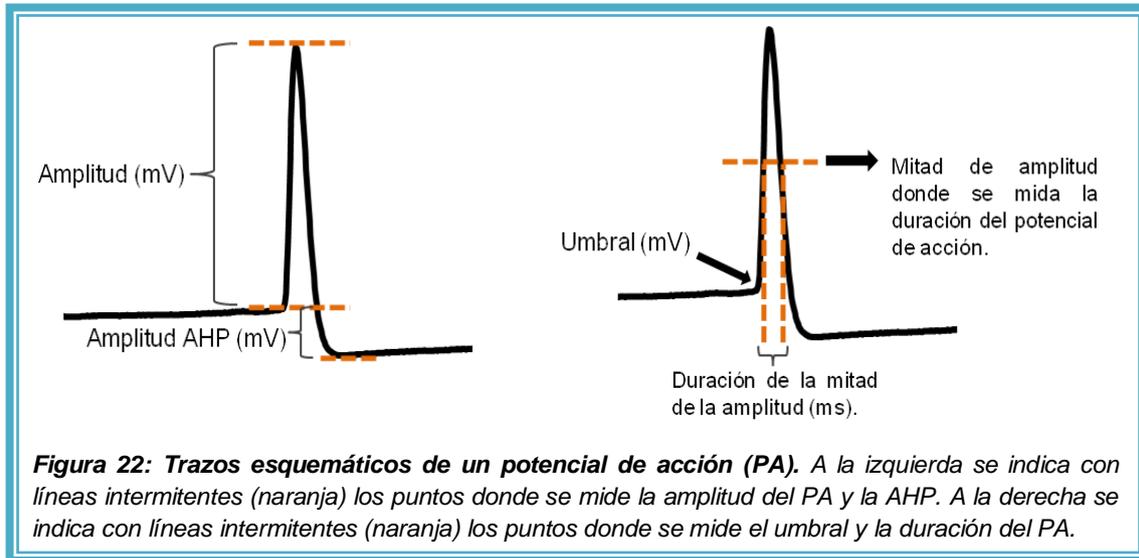
Los cortes se anclaron en una cámara de registro y se perfundieron constantemente con LCFa oxigenado, con bloqueantes de los receptores de glutamato (ácido kinurenico 2,5 mM, Sigma Aldrich, Argentina) y GABA-A (gabazina 4µM, abcam SR95531) a un caudal de 2–3 ml / min, con el objetivo de prevenir las influencias de despolarización/hiperpolarización de las membranas dendríticas en el soma.

Las pipetas de registro (3–5 M Ω) fueron realizadas con capilares de vidrio Corning 7056 (Corning, NY) con un “puller” de pipetas horizontal (Flaming / Brawn P-97, Sutter Instruments, Novato, CA) y se llenaron con una solución interna de registro (K⁺-gluconate 120mM, HEPES 10mM, EGTA 0,1mMKCl 20mM, MgCl₂ 2mM, Na₂ATP 3mM, Na₂GTP 0,3mM, y biocitina 0,1% (Sigma Aldrich, Argentina); pH 7,4, 280 mOsm /L). La biocitina se agregó a la solución interna con el objetivo de verificar la localización de la célula que se registró y analizar la plasticidad estructural (ver métodos de espinas y arborización dendrítica).

Los registros se iniciaron con la identificación visual de las neuronas (MSN) en el NAc, mediante microscopia de contraste de interferencia diferencial (DIC) y un amplificador (Axopatch 200B, AxonInstruments, Union City, CA), se utilizó la configuración “whole-cell” (única célula) en modo “current-clamp” (corriente clampeada). Las señales de voltaje se registraron, amplificaron y digitalizaron mediante una interfaz (DigiData 1322A Series) que permitió su captura mediante un software de análisis (pCLAMP 9; Axon Instruments).

Los potenciales de acción (“spikes”) dependientes de Na⁺ se generaron inyectando pulsos de corrientes despolarizantes a partir de 0 hasta 0,4 nA con incrementos de 0,05 nA y 200 ms de duración obteniendo la curva de N° de potenciales en función de la corriente (I-spikes). Las características de los potenciales de acción se obtuvieron a partir del primer registro evocado por el mínimo pulso de corriente despolarizante (corriente para generar el PA) en cada MSN registrada. En todos los casos, los potenciales de Na⁺ fueron evocados a partir del potencial de membrana en reposo (RMP), el cual se mantuvo constante a –80 mV (cerca de la media de –78 mV, característico de este tipo de neuronas). De esta manera todas las neuronas se mantuvieron a un mismo nivel de potencial basal, por lo tanto, los resultados obtenidos de diferentes células fueron comparables (Hu *et al.*, 2004). La amplitud del potencial de acción (mV) se midió desde el umbral (mV) del disparo hasta su pico máximo. La amplitud del periodo refractario (AHP del inglés “after hyperpolarization period”, mV) se midió desde el punto equipotencial del umbral del disparo hasta la deflexión máxima de la hiperpolarización de la membrana

después del final del potencial de acción. La duración de la mitad de la amplitud de los potenciales se midió en el nivel de amplitud en el que se alcanzó la



mitad del pico. El RMP fue medido en ausencia de corriente (Figura 22).

La relación corriente-voltaje (curva I-V) se estudió hiperpolarizando la membrana celular administrando pulsos de corrientes negativas de -0,8 a 0 nA con un intervalo de 0,05 nA, con una duración de 200 ms cada pulso. Bajo estas condiciones, los cambios registrados en la curva I-V reflejan la activación o inactivación de corrientes de potasio hacia el interior de la célula (I_{kir} : del inglés "inward rectifiers potassium currents (Nisenbaum & Wilson, 1995). La resistencia de la membrana (R_{in} : del inglés "input resistance", $M\Omega$) fue determinada por la regresión en el rango lineal (generalmente ± 10 mV del RMP) de la curva I-V establecida al trazar el cambio de voltaje, en estado estable, de la respuesta a pulsos de corrientes despolarizantes e hiperpolarizantes. Para el análisis de las propiedades de la membrana solo se usaron células del NAc que presentaron un RMP estable y más negativo que -75 mV con picos evocados que sobrepasaron los potenciales de membrana de 0-mV.

Análisis de plasticidad estructural:

Luego de finalizar los registros electrofisiológicos, las rebanadas de cerebro conteniendo el NAc fueron fijadas con una solución de PFA 4% mantenidas a 4°C hasta una semana.

Inmuno-química:

Los cortes fueron lavados con PBS-T (PBS 0,1M + tritón al 0,5%), luego se agregó una solución de bloqueo (PBS-T + suero de cabra al 3%) durante 1 hora e inmediatamente después se incubó con streptavidina-Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen, S11223), la cual presenta una alta afinidad por biocitina, en solución de bloqueo durante 2hs a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados con PBS-T y posteriormente montados en porta objetos de vidrios con fluorsave (Calbiochem).

Las distintas imágenes de fluorescencia se obtuvieron a través de microscopia confocal (Olympus - Fluoview FV-1000; Centro de Microscopía Óptica y Confocal Avanzada, Córdoba, Argentina). Con el objetivo de verificar la localización de las MSN (Figura 23), se obtuvieron imágenes con un objetivo de 10X. Para determinar la arborización dendrítica secciones ópticas en el eje Z fueron obtenidas a pasos de 0,5 μm con un objetivo de 20X. Para la cuantificación de la densidad de espinas dendríticas, las imágenes de las mismas se obtuvieron con un objetivo de 60X en el plano Z cada 0,1 μm .

Espinas dendríticas:

Fueron identificadas como protrusiones pequeñas que se extienden no más de 3 μm desde la dendrita pariente. Las estructuras más largas son consideradas como filopodias. Solamente las espinas que aparecen en forma continua con la dendrita fueron cuantificadas. El largo de la dendrita fue medido y el número de espinas normalizado por 10 μm de dendrita utilizando el software ImageJ. El análisis estadístico se realizó utilizando un ANOVA de una vía.

Arborización dendrítica:

El estudio de la arborización dendrítica se realizó mediante el análisis de Sholl (Sholl, 1953) utilizando el software ImageJ. Los anillos concéntricos con radios crecientes (10 μm desde el soma, con incrementos de 30 μm) se centraron alrededor del soma y se cuantificaron las intersecciones de las ramas dendríticas con los anillos en cada radio. Los resultados se expresan como la media de las intersecciones totales, y como la media de las intersecciones por

cada radio, y fueron analizados mediante un ANOVA de una vía y un ANOVA de medidas repetidas, con el radio de cada anillo como medida repetida respectivamente.

Procedimiento de Western Blot:

Inmediatamente después del test conductual (LCE) un grupo de animales fueron decapitados con guillotina. Sus cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en hielo. Se prepararon cortes coronales de cerebro de 2 mm que contenían el NAc. El resto del procedimiento se llevó a cabo como se describió en el objetivo III (ver página 63).

Determinación de nitritos y nitratos:

Inmediatamente después del test conductual (LCE) se utilizó un grupo de animales para determinar la concentración de nitritos y nitratos (metabolitos estables del ON) utilizando la técnica de Griess. Para ello, los animales provenientes de cada grupo experimental fueron decapitados con guillotina. Sus cerebros fueron removidos rápidamente y colocados en hielo. Se prepararon cortes coronales de cerebro de 4mm que contenían el NAc. El tejido se homogeneizó con 200µL de buffer HEPES 20mM, pH 7,4 y el homogenato se centrifugó a 12000g durante 10min a 4°C. El sobrenadante (100µL) se incubó con 100µL de reactivo de Griess (Britania, B1550161) durante 20 minutos. Para determinar la concentración de nitritos y nitratos, se realizó una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones crecientes de solución de NaNO₂ en agua destilada, en un rango desde 1,17 hasta 37,5 µmoles/L, y se detectó la reacción colorimétrica con un lector de microplacas (BioRad modelo 680) a una longitud de onda de 540 nm. Una alícuota de sobrenadante fue utilizada para la determinación del contenido de proteínas mediante el método de Bradford (Bio Rad Bradford Protein Assay). Los resultados se expresaron como la concentración [µM] de nitritos y nitratos/proteínas totales (µg/µl).

RESULTADOS:

La abstinencia a DZ coincide con una disminución en la excitabilidad intrínseca (plasticidad homeostática) y en la plasticidad estructural de las MSN en el NAc.

Patch- Clamp: Cuando se analizó la curva I-spikes, el ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostró una diferencia significativa de la interacción (N° de potenciales vs. Corriente) [$F_{(12, 78)} = 7,02$; $p=0,0001$] y de la corriente aplicada [$F_{(6, 78)} = 174,8$; $p=0,0001$] sin efecto del tratamiento (VEH o DZ) [$F_{(2, 13)} = 1,68$; $p=0,2244$; Figura 23]. El análisis a *posteriori* mostró una disminución significativa en el N° de potenciales evocados en los pulsos de corrientes despolarizantes de 0,35 y 0,4 nA en el grupo DZ-D cuando se comparó con los grupos VEH ($p^* < 0,05$) y DZ-ND ($p^* < 0,05$), mientras que los grupos VEH y DZ-ND no son diferentes entre ellos ($p > 0,05$). En el pulso de corriente de 0,3 nA el N° de potenciales evocados fue menor en el grupo DZ-D cuando se comparó con el grupo VEH ($^{\#}p < 0,05$), los grupo VEH y DZ-ND ($p > 0,05$) no son distintos entre ellos en este pulso de corriente.

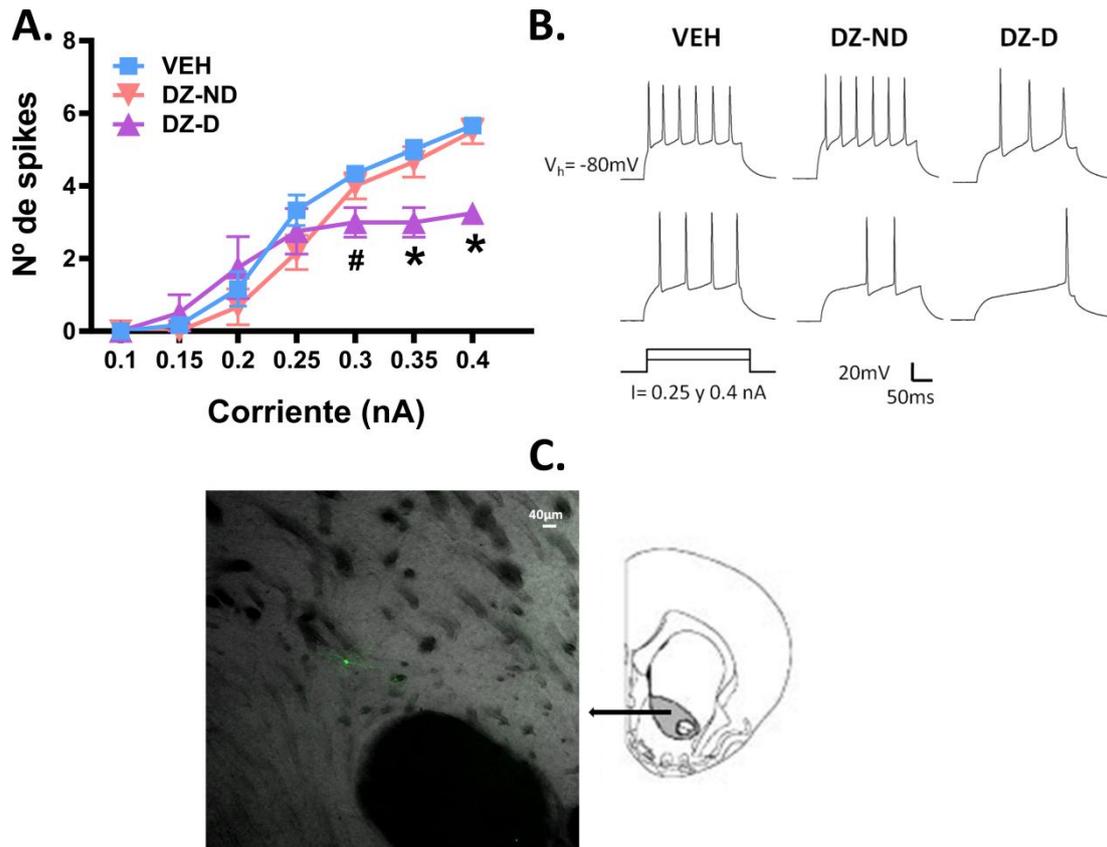


Figura 23: Número de spikes en función de la corriente aplicada 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. A) El gráfico muestra el número de potenciales de acción evocados a distintos pulsos de corriente despolarizantes (nA) para los grupos VEH (n=5 ratas, 6 células), DZ-D (n=3 ratas, 4 células), DZ-ND (n=5 ratas, 6 células) # $p < 0,05$ con respecto a VEH, * $p < 0,05$ con respecto a VEH y DZ-ND. Los símbolos representan las medias \pm SEM. **B)** Trazos representativos de los potenciales de acción evocados en los pulsos de corrientes de 0,25 y 0,4 nA en los grupos experimentales VEH, DZ-D y DZ-ND. **C)** Una neurona espinal mediana (MSN) del NAc core marcada con biocitina-Alexa 488.

El ANOVA de dos vías de medidas repetidas de la curva I-V basada en las alteraciones en el potencial de membrana (mV) en respuesta a los pulsos de corriente hiperpolarizantes aplicados, mostró un efecto significativo de la interacción (corriente vs. Potencial de membrana) [$F_{(32, 272)} = 2,18$; $p = 0,0004$], de la corriente [$F_{(16, 272)} = 242,3$; $p = 0,0001$], sin efecto del tratamiento (VEH o DZ) [$F_{(2, 17)} = 3,59$; $p = 0,0502$; Figura 24]. El análisis a *posteriori* mostró, en las corrientes -0,8, -0,75, -0,7, -0,65, -0,6 y -0,55 nA una disminución en el potencial de membrana en el grupo DZ-D cuando se comparó con los grupos VEH ($p^* < 0,05$) y DZ-ND ($p^* < 0,05$), mientras que VEH y DZ-ND no son

diferentes entre ellos para estos pulsos de corriente ($p > 0,05$). En las corrientes hiperpolarizantes $-0,5$ y $-0,45$ nA el test a *posteriori* mostró una disminución en el potencial de membrana en el grupo DZ-D con respecto al grupo DZ-ND ($\#p < 0,05$), no se observaron diferencias significativas en el grupo VEH cuando se lo comparó con DZ-D ($p > 0,05$) y con DZ-ND ($p > 0,05$).

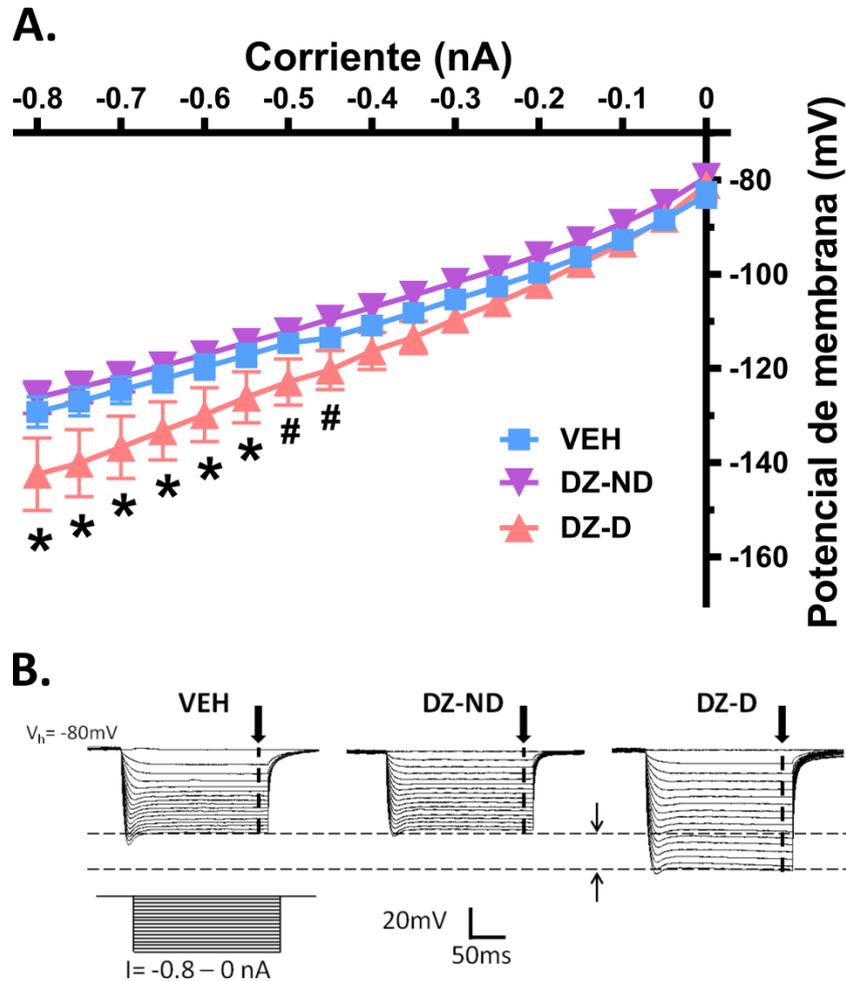


Figura 24: Rectificación Inward 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. **A)** El gráfico muestra los potenciales de membrana (mV) a distintos pulsos de corrientes hiperpolarizantes (nA) para los grupos VEH ($n=5$ ratas, 6 células), DZ-D ($n=3$ ratas, 4 células), DZ-ND ($n=5$ ratas, 6 células) $\#p < 0,05$ con respecto a VEH, $*p < 0,05$ con respecto a VEH y DZ-ND. Los símbolos representan las medias \pm SEM. **B)** Trazos representativos de los potenciales de membrana en los pulsos de corriente hiperpolarizantes desde $-0,8$ hasta 0 nA, con intervalos de $0,05$ nA en los grupos experimentales VEH, DZ-D y DZ-ND. La flecha indica el punto donde se midió el potencial de membrana.

Las propiedades pasivas y activas de la membrana de las MSN se estudiaron y resumieron en la Tabla 3. El ANOVA de una vía mostró una diferencia significativa en la duración del PA [$F_{(2, 14)} = 20,03$; $p = 0,0001$] y en la

resistencia de la membrana (Rin) [$F_{(2, 14)} = 5,31$; $p = 0,0192$]. Los análisis *a posteriori* mostraron un aumento en la duración del PA y en la Rin en el grupo DZ-D cuando se comparó con los grupos DZ-ND y VEH ($p < 0,05$), los grupos DZ-ND y VEH no presentaron diferencias entre ellos en ambos parámetros ($p > 0,05$). El análisis de las otras propiedades de membrana no arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales.

PARAMETRO	VEH	DZ-D	DZ-ND	ANOVA de una vía
n= (ratas; células)	n= (5; 6)	n= (3; 4)	n= (5; 6)	
Propiedades pasivas:				
RMP (mV)	76,34 ± 1,52	76,96 ± 1,29	76,24 ± 1,61	$F_{(2,13)} = 0,05$; $p = 0,9480$
Resistencia de membrana (Rin)	89,08 ± 4,3	108,6 ± 7,98	80,25 ± 5,86	$F_{(2,13)} = 5,41$; $p = 0,0195^*$
Propiedades activas:				
Corriente para generar el PA (nA)	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,01	$F_{(2,13)} = 2,81$; $p = 0,0965$
Umbral (mV)	37,17 ± 2,56	39,63 ± 2,37	35,12 ± 1,31	$F_{(2,13)} = 1,01$; $p = 0,3917$
Amplitud del PA (mV)	77,68 ± 2,28	72,9 ± 2,58	79,93 ± 1,35	$F_{(2,13)} = 2,69$; $p = 0,1056$
Duración del PA (ms)	2,03 ± 0,06	2,56 ± 0,08	1,72 ± 0,09	$F_{(2,13)} = 26,0$; $p = 0,0001^*$
AHP amplitud (mV)	13,55 ± 0,1	12,38 ± 1,1	13,72 ± 0,67	$F_{(2,13)} = 0,55$; $p = 0,5921$

Tabla 3: Propiedades activas y pasivas de la membrana de las MSN del NAc core, $*p < 0,05$.

Plasticidad estructural: Los resultados de plasticidad estructural mostraron una reducción en la densidad de espinas dendríticas en el NAc luego de la interrupción de la administración crónica con DZ, ya que el ANOVA de una vía indicó un efecto significativo [$F_{(2, 41)} = 7,01$; $p = 0,0024$; Figura 25]. El análisis *Newman-Keuls* mostró que la densidad de espinas fue significativamente menor en los grupos DZ-D ($12,99 \pm 0,9$) y DZ-ND ($14,73 \pm 0,78$) cuando se comparó con el grupo VEH ($17,26 \pm 0,72$; $*p < 0,05$), mientras que entre los grupos DZ-D y DZ-ND no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$). El

ANOVA de medidas repetidas de los resultados obtenidos del análisis de Sholl mostraron un efecto significativo en el radio de los anillos (μm desde el soma) [$F_{(6, 36)}= 53,97$; $p=0,0001$], sin efecto entre los grupos (VEH, DZ-D y DZ-ND) [$F_{(2, 6)}= 3,37$; $p=0,1045$], ni en la interacción (grupo vs. radio de los anillos) [$F_{(12, 36)}= 1,75$; $p=0,0974$]. El análisis a *posteriori* mostró una disminución en la arborización dendrítica, a los 60 y 90 μm desde el soma, en los grupos DZ-D y DZ-ND comparados con el grupo VEH ($*p<0,05$), sin diferencias significativas entre los grupos DZ-D y DZ-ND ($p>0,05$). Por último el ANOVA de una vía evidenció un efecto significativo en las medias de las intersecciones totales [$F_{(2, 6)}= 6,71$; $p=0,0295$]. El análisis a *posteriori* mostró una disminución significativa en los grupos DZ-D ($5,42 \pm 0,49$) y DZ-ND ($5,17 \pm 0,37$) cuando se los comparó con el grupo VEH ($7,88 \pm 0,79$; $*p<0,05$), los grupos DZ-D y DZ-ND no fueron diferentes entre ellos ($p>0,05$).

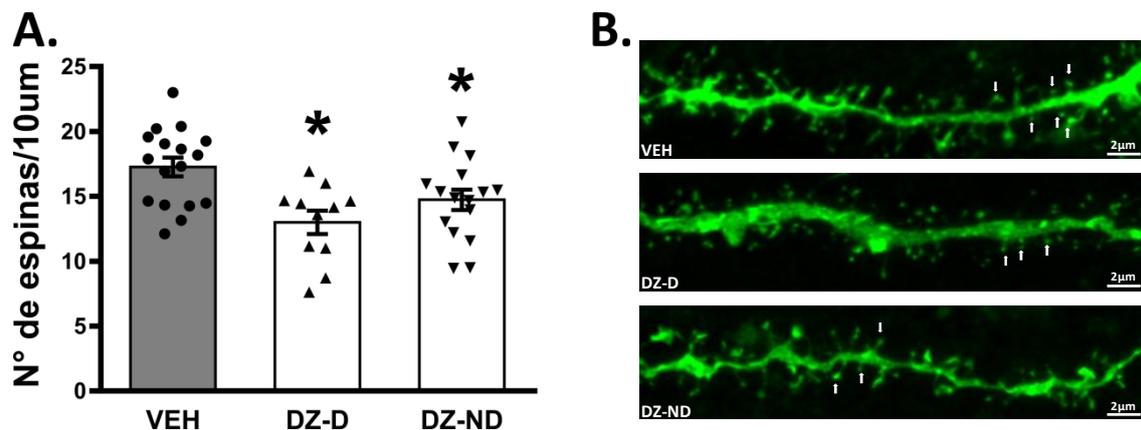


Figura 25: Resultados de la densidad de espinas dendríticas en las MSN del NAc core 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. A) El gráfico de barras que representa la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestra, el número de espinas dendríticas cada 10 μm de dendrita en los grupos VEH ($n=17$ dendritas, 624,45 μm total, 3 ratas), DZ-D ($n=11$ dendritas, 432 μm total, 3 ratas), DZ-ND ($n=16$ dendritas, 533,76 μm total, 3 ratas), $*p<0,05$ vs. VEH. B) Imágenes representativas de una dendrita de cada grupo experimental.

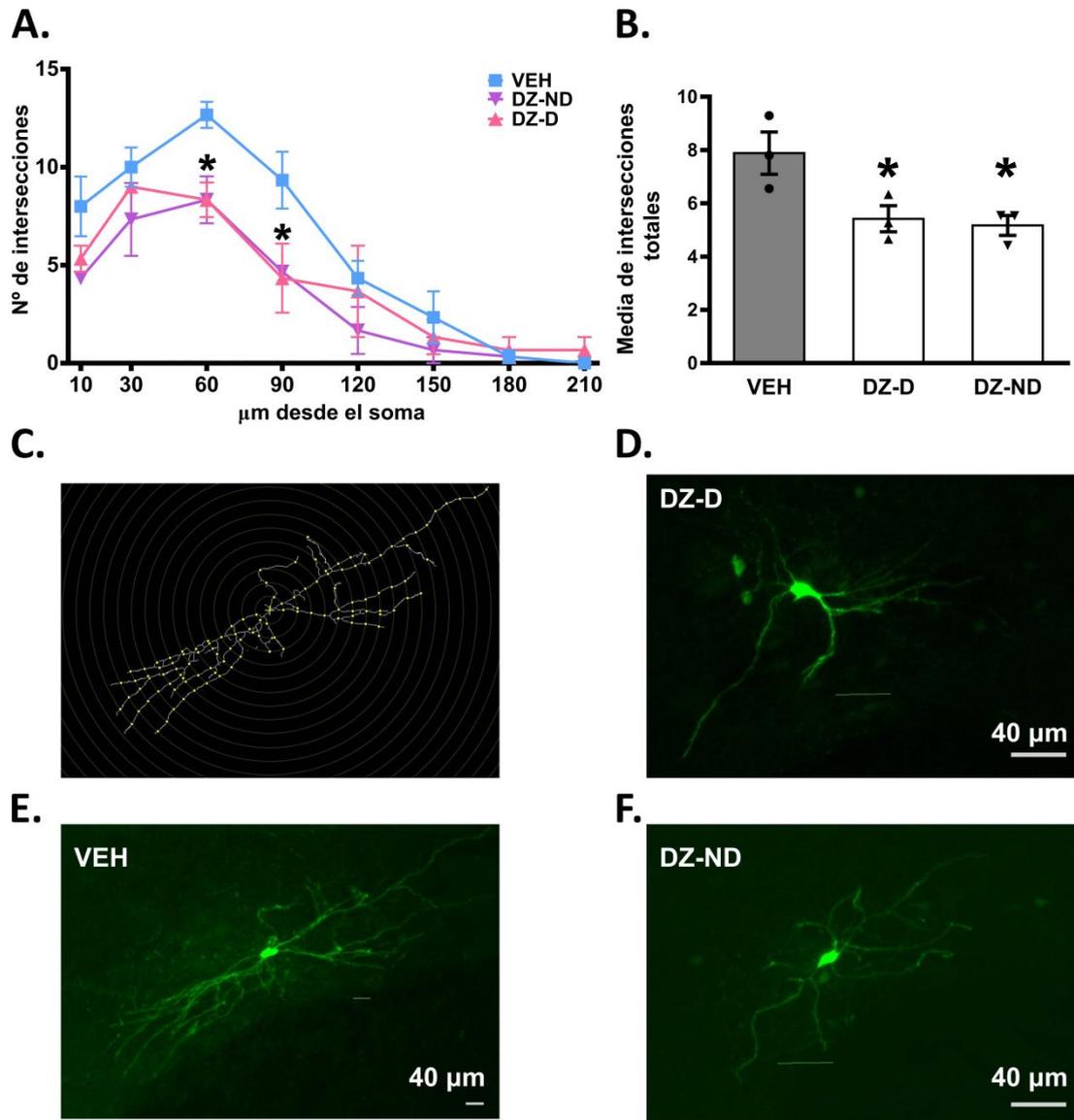


Figura 26: Resultados de la arborización de espinas dendríticas en las MSN del NAc core 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. A) El gráfico muestra el número de intersecciones en cada anillo concéntrico con radios crecientes para los grupos VEH ($n=3$ células, 3 ratas), DZ-D ($n=3$ células, 3 ratas) y DZ-ND ($n=3$ células, 3 ratas). Los símbolos representan la media \pm SEM. $*p<0,05$ con respecto a todos los grupos. **B)** El gráfico de barras que representa la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales, muestra la media de las intersecciones totales para los grupos VEH ($n=3$ células, 3 ratas), DZ-D ($n=3$ células, 3 ratas) y DZ-ND ($n=3$ células, 3 ratas), $*p<0,05$ vs. VEH. **C)** Imagen representativa de una célula del grupo VEH, donde se observan los anillos concéntricos con radios crecientes resultantes del análisis de Sholl. **D, E y F)** Imágenes representativas de la arborización de las neuronas espinales medianas (MSN) de los grupos experimentales.

La expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ se relaciona con una disminución en la expresión de NOS-1 y en la concentración de metabolitos de ON en el NAc.

Cuando se analizaron los niveles de proteína NOS-1 en el NAc, el ANOVA de una vía indicó un efecto significativo [$F_{(2, 17)} = 4,86$; $p = 0,0214$; Figura 27-A y B]. El análisis a *posteriori* mostró que la expresión de NOS-1 fue significativamente menor en el grupo DZ-D ($0,77 \pm 0,06$ OD) cuando se comparó con los grupos VEH ($0,99 \pm 0,05$; $*p < 0,05$) y DZ-ND ($1,06 \pm 0,09$ OD; $*p < 0,05$), mientras que los grupos VEH y DZ-ND no son diferentes entre ellos ($p > 0,05$).

Por último, el análisis de la concentración de nitritos y nitratos en el NAc mostró un efecto significativo en el ANOVA de una vía [$F_{(2, 16)} = 5,62$; $p = 0,0142$; Figura 27-C]. El análisis a *posteriori* mostró que la concentración de nitritos y nitratos fue significativamente menor en el grupo DZ-D ($0,0086 \pm 0,0008$ μM) cuando se comparó con los grupos VEH ($0,0125 \pm 0,0011$ μM ; $*p < 0,05$) y DZ-ND ($0,0118 \pm 0,0007$ μM ; $*p < 0,05$), mientras que no se encontraron diferencias entre los grupos VEH y DZ-ND ($p > 0,05$).

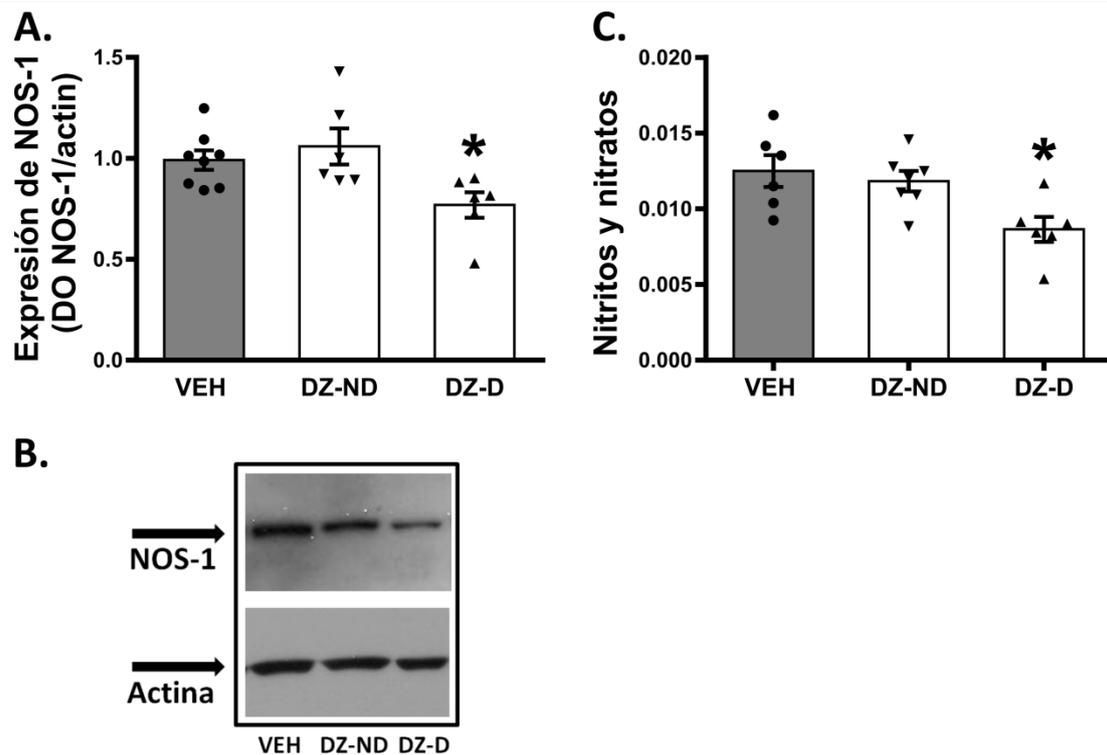


Figura 27: Resultados moleculares en el NAc 48 horas después de la última administración de DZ utilizando el protocolo control. Los gráficos de barras que representan la media \pm SEM y la dispersión de los resultados individuales muestran: **A)** La expresión de NOS-1 cuantificada como la densidad óptica (DO) de NOS-1/ DO de actina, en los grupos VEH ($n=8$), DZ-D ($n=6$) y DZ-ND ($n=6$). $*p<0,05$ comparado con todos los grupos. **B)** Imágenes representativas de las membranas de western-blot indicando la marca de NOS-1 a 160 KDa y de actina a 43 KDa, las marcas corresponden a los grupos de izquierda a derecha (VEH, DZ-ND y DZ-D). **C)** La concentración de nitritos y nitratos cuantificada como μM de nitritos y nitratos/ proteínas totales ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en los grupos VEH ($n=6$), DZ-D ($n=6$) y DZ-ND ($n=7$). $*p<0,05$ comparado con todos los grupos.

CONCLUSIONES PARCIALES:

Estos resultados permitieron caracterizar la excitabilidad neuronal en el NAc luego de la administración crónica de DZ. Se ha observado que los animales que expresaron un comportamiento de “tipo ansioso” (DZ-D) presentaron una disminución en la excitabilidad neuronal de las MSN del NAc ya que se evidenció un menor número de potenciales de acción evocados. Sin embargo, los animales que no expresaron “ansiedad” durante la abstinencia (DZ-ND) no mostraron un cambio en la excitabilidad neuronal respecto al grupo control, a pesar de haber recibido un tratamiento crónico con DZ.

Se ha descrito que en las MSN del NAc se expresan varios subtipos de canales I_{Kir} , incluidos los clásicos canales de potasio inward (IRK1–3 o Kir 2,1–

3) y los activados por proteína G (GIRK1 y 3, o Kir 3,1 y Kir 3,3) (Karschin *et al.*, 1996). Estos canales se activan en respuesta a la hiperpolarización de la membrana y se inactivan durante la despolarización, ejerciendo un papel importante en diversas funciones celulares, especialmente en la regulación de la homeostasis del potasio, la inhibición sináptica, la activación neuronal y la conductancia en reposo (Wang, 1995; D'Ambrosio *et al.*, 2002). Los resultados de este capítulo muestran que durante la expresión de dependencia a DZ (DZ-D) la rectificación inward se encuentra atenuada, indicando una posible reducción de las corrientes I_{Kir} . Esta reducción podría impactar en la función de estos canales generando una mayor dificultad en regular la homeostasis del potasio. Estos resultados se asocian a una R_{in} incrementada y una mayor duración del PA en el grupo DZ-D, sugiriendo que la función de otros canales iónicos puede estar alterada durante la abstinencia a DZ. Curiosamente, al igual que los resultados obtenidos en la excitabilidad neuronal, los animales que no expresaron un comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia (DZ-ND) no mostraron un cambio en la I_{Kir} , R_{in} o duración del PA respecto del grupo control, a pesar de haber sido expuestos a una administración crónica de DZ.

Es interesante destacar que la disminución en la excitabilidad celular de las MSN en el grupo DZ-D se acompañó con cambios en la plasticidad estructural de dichas células, ya que se evidenció una disminución en la densidad de espinas dendríticas y de la arborización de las dendritas durante la abstinencia a DZ. Sin embargo, a diferencia de los resultados anteriores, estos cambios serían generados por la exposición a DZ y no por la expresión del síndrome de abstinencia, ya que no observamos diferencias entre los grupos DZ-D y DZ-ND.

En relación a la neurotransmisión nitrérgica, se ha demostrado que el aumento de la disponibilidad de ON en el NAc incrementa los disparos espontáneos de las MSN (West & Grace, 2004). Además, la inhibición de la NOS-1 interfiere con la formación de nuevas sinapsis resultando en la pérdida de espinas dendríticas (Nikonenko *et al.*, 2008; Yoshihara *et al.*, 2009). Nuestros resultados mostraron que la expresión de un comportamiento de “tipo

ansioso” durante la abstinencia (DZ-D) se acompañó con una disminución en la expresión de NOS-1 en el NAc y probablemente de la actividad de esta enzima, ya que se ha demostrado que la concentración de nitritos y nitratos en tejido cerebral es un método apropiado para correlacionar su actividad *in vivo* (Salter *et al.*, 1996). Por lo tanto, ésta probable disminución de la disponibilidad del ON en el NAc podría explicar la reducción en la excitabilidad y plasticidad estructural de las MSN durante la abstinencia a DZ.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN GENERAL:

La dependencia a drogas a menudo se relaciona con un fenómeno de aprendizaje contextual (Robbins & Everitt, 1996) y parece ser el principal mecanismo que subyace al desarrollo de dependencia a BZDs, en el que el entorno contextual durante la administración de drogas cumple un rol fundamental en el establecimiento de la dependencia física y la abstinencia, tanto en animales como en humanos (Griffiths & Weerts, 1997; Perez *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta estas observaciones, en este trabajo se pudo evitar la expresión de un comportamiento de "tipo ansioso" característico del síndrome de abstinencia a DZ al interferir con el proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia a DZ. El protocolo de IL, que consistió en la pre-exposición al contexto de administración que formó parte durante el tratamiento crónico a DZ, aplicado los últimos días de un protocolo de administración a largo plazo evitó con éxito la expresión del comportamiento de "tipo ansioso" característico del síndrome de abstinencia a DZ.

Estudios previos han demostrado, que el efecto ansiogénico característico del síndrome de abstinencia a DZ se acompaña por una inmunoreactividad Fos positiva significativa aumentada en áreas telencefálicas, diencefálicas y mesencefálicas relacionadas con los circuitos de la ansiedad y el miedo en el cerebro (Fontanesi *et al.*, 2007), así como por un incremento en la actividad de las neuronas noradrenérgicas del Locus Coeruleus (Perez *et al.*, 2001) y serotoninérgicas del Núcleo del Rafe Dorsal (Almiron & Ramirez, 2005). Todos estos cambios pueden contribuir no solo a los síntomas de abstinencia física que involucran la función autónoma, sino también al aumento de la plasticidad hipocampal que subyace al desarrollo de dependencia y abstinencia a DZ (Perez *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2009; Monti *et al.*, 2010). El HP, a través de sus conexiones con estructuras como la amígdala o la corteza prefrontal medial, entre otras, es una estructura cerebral implicada en la modulación contextual de las respuestas condicionadas en los paradigmas de interferencia del aprendizaje (Bouton, 2002) y también en el condicionamiento contextual (Maren, 2008). En el presente trabajo, se demostró que la

efectividad del protocolo de IL en la prevención del comportamiento de "tipo ansioso" durante la abstinencia a DZ, se asocia con la reversión de la aumentada plasticidad sináptica en el HP, ya que el umbral para generar LTP en animales abstinentes a DZ es similar al del grupo control. Este resultado confirmó informes anteriores que mostraron que el incremento en la plasticidad hipocampal observada durante la tolerancia (Marin *et al.*, 1999) y dependencia a DZ (Perez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2002; Monti *et al.*, 2010) se asocia positivamente a la expresión de algunos de los signos conductuales de abstinencia de DZ; mientras que la ausencia de un comportamiento similar a la ansiedad, como se describe en este estudio cuando se realizó el protocolo de IL, se asocia a una transmisión sináptica hipocampal comparable a los valores del control. De manera similar, otros protocolos de administración crónica de drogas, como los tratamientos repetidos de cocaína, han demostrado un efecto modulador sobre la plasticidad sináptica en el HP (Black *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; del Olmo *et al.*, 2006). Particularmente, esta alta eficiencia de la transmisión sináptica en el HP, evidenciada por una reducción dramática en el umbral para generar LTP, caracteriza a las ratas sensibilizadas al efecto hiperlocomotor de cocaína, mientras que los animales no sensibilizados con cocaína mostraron valores de umbral más altos (Perez *et al.*, 2010; Gabach *et al.*, 2013; Artur de la Villarmois *et al.*, 2019). Entonces, la mejora de la transmisión sináptica del HP puede representar un mecanismo común reclutado por drogas con diferentes mecanismos de acción para mantener los cambios estructurales que subyacen a las modificaciones persistentes en la función cerebral después de la exposición repetida o durante la abstinencia de drogas de abuso.

En este escenario, el ON parece jugar un rol importante no solo en los procesos de aprendizaje y memoria (Park *et al.*, 1998) y en el mantenimiento del LTP en el HP (Bon & Garthwaite, 2003), sino también en la expresión de la abstinencia de BZDs en ratones y ratas, ya que la inhibición farmacológica de NOS-1 impidió la expresión de algunos síntomas característicos del síndrome de abstinencia (Talarek *et al.*, 2011). En esta tesis, se demostró que la expresión del comportamiento de "tipo ansioso" característico del síndrome de abstinencia a DZ no afecta los niveles de proteína NOS-1 en el HP (dorsal o

ventral), aunque no es posible descartar que aumentos en su actividad puedan contribuir a la mayor plasticidad en el HP y a la expresión del comportamiento de "tipo ansioso". Por otro lado, los animales que recibieron DZ con el protocolo de IL mostraron niveles reducidos de proteína NOS-1 y probablemente presenten una menor disponibilidad de ON dentro del HP dorsal, tal vez como un mecanismo compensatorio para reducir la plasticidad sináptica en el HP y evitar la expresión de un comportamiento "ansioso". Además, la inhibición farmacológica sistémica de NOS-1 mostró resultados conductuales y electrofisiológicos similares a los observados en animales sometidos al protocolo de IL, lo que indica que una disponibilidad reducida de ON podría ser responsable de los efectos inducidos por la IL. Estos resultados concuerdan con hallazgos anteriores que indican que la inhibición aguda de la síntesis de ON disminuye la ansiedad en la prueba del LCE en ratas (Faria *et al.*, 1997). Por último es importante señalar que la reducción en los niveles de proteína NOS-1, cuando se realizó la interferencia del aprendizaje (IL), solo se observaron en el HPd, una región involucrada principalmente en el proceso cognitivo de aprendizaje y memoria (Fanselow & Dong, 2010). Sin embargo, no se descarta la posibilidad que el protocolo de IL sea capaz de inducir cambios en la transmisión sináptica, o en los niveles de NOS-1, incluyendo alguna de sus tres variantes α , β ó γ , en otras estructuras cerebrales que puedan explicar también su participación en la expresión de la abstinencia a DZ.

La dependencia es un fenómeno que presenta una notable variabilidad inter-individual y la intensidad de la necesidad o compulsión por consumir varía entre las diversas personas. Cuando se logra diagnosticar la dependencia en pacientes que fueron sometidos a un tratamiento terapéutico con BDZs, el cambio a un estado de dependencia solo ocurre en una fracción de los usuarios (Wagner & Anthony, 2002). Se ha descrito que aproximadamente el 35% de los pacientes tratados durante más de 4 semanas con BZDs desarrollan dependencia, y cuanto mayores hayan sido las dosis utilizadas y más prolongado el tratamiento, más intenso es el síndrome de abstinencia (Hurlé *et al.*, 2008). Actualmente se propone que estas vulnerabilidades interindividuales a la predisposición de desarrollar adicción se debe en parte a factores genéticos, ya que se demostró que en pares de gemelos idénticos y no

idénticos, cuando un gemelo era adicto al alcohol, el otro gemelo idéntico también tenía una alta probabilidad de volverse adicto. Sin embargo, cuando un gemelo no idéntico era adicto, el otro gemelo no necesariamente desarrollaba una adicción (Prescott & Kendler, 1999; Enoch & Goldman, 2001; Goldman *et al.*, 2005). Otro estudio investigó a los familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) de 231 adictos y 61 no adictos. Este análisis mostró que si un padre presentaba adicción a drogas o alcohol, la posibilidad de que el hijo desarrollara una adicción era de 8 veces mayor (Merikangas *et al.*, 1998). Aunque los factores genéticos parecen estar implicados, las influencias ambientales no deben subestimarse. Hasta el momento no hay una respuesta clara sobre cuáles son los genes sensibles responsables de la adicción, pero las mutaciones genéticas específicas se han relacionado con la sensibilidad al consumo de alcohol y BZDs (Iwata *et al.*, 1999; Schuckit *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2005).

En esta tesis, la diferenciación conductual entre animales DZ-D y DZ-ND que se realizó con el objetivo de estudiar el impacto de los protocolos de administración de DZ en la distribución poblacional, reproduce la variabilidad inter-individual observada en humanos en relación al desarrollo de dependencia a BZDs. Los resultados mostraron que cuando se administró DZ utilizando el protocolo control el 38% de los animales expresaron “ansiedad”, mientras que cuando se utilizó el protocolo de IL se observó una tendencia a la disminución de animales dependientes ya que el 18,75 % perteneció al grupo DZ-D. En el caso del protocolo con 7-NI, la disminución en la población de animales dependientes fue aun mayor, ya que solo el 8,34 % fueron considerados “dependientes” a pesar de haber recibido DZ de manera crónica. Estas evidencias confirman que los protocolos de administración de DZ utilizados en este trabajo tienen un impacto en la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” característico del síndrome de abstinencia a DZ.

El NAc es un componente central del estriado ventral que se posiciona como una interfaz para integrar señales que surgen de las áreas límbicas y corticales y así modular la salida motora relacionada con comportamientos dirigidos a un objetivo (Mogenson *et al.*, 1983; French & Totterdell, 2002). El

NAC recibe y envía proyecciones de distintas aéreas del SNC, por ejemplo, recibe conexiones aferentes excitatorias del tipo glutamatérgicas, provenientes del HP, corteza pre-frontal y amígdala, que proporcionan la unidad excitadora necesaria para evocar el comportamiento. El HP proporciona información espacial y contextual acerca de diferentes estímulos (Brog *et al.*, 1993; Sesack & Grace, 2010) y las conexiones directas e indirectas entre el HP y el NAC pueden permitir que dichas señales contextuales influyan en el comportamiento de búsqueda de drogas (Jentsch & Taylor, 1999). Además, funcionalmente estas estructuras se regulan de forma bi-direccional. Por ejemplo, el NAC está involucrado en la modulación de la plasticidad sináptica hipocampal, ya que la estimulación eléctrica del NAC core evita todas las formas de LTP, incluida su inducción, en las células granulares del GD en el HP (Lopez *et al.*, 2008). Por otro lado, la potenciación de la actividad sináptica en las aferencias provenientes del HP potenciarían la inhibición GABAérgica de las interneuronas del NAC, reduciendo la actividad de las MSN (Mulder *et al.*, 1998). En concordancia con estos antecedentes funcionales, en esta tesis se describe por primera vez que el tratamiento crónico con DZ o que el incremento del comportamiento de “tipo ansioso” luego de la discontinuación de la administración crónica con DZ (grupo DZ-D), generarían una disminución de la excitabilidad, acompañada por una reducción de la plasticidad estructural en las células principales del NAC. Estos cambios observados en las MSN también fueron descritos para otras drogas de abuso, por ejemplo hay reportes que demostraron una disminución en la excitabilidad de las MSN del NAC en ratas abstinentes luego de un tratamiento crónico con cocaína (Perez *et al.*, 2011), en este sentido es importante destacar que se observó nuevamente que el DZ induce cambios similares a otras drogas de abuso en el HP y en el NAC, indicando la presencia de mecanismos plásticos adaptativos similares entre las drogas que inducen comportamientos de búsqueda. Otro actor importante en la modulación de la actividad y arborización dendrítica de las MSN es el ON (West & Grace, 2004; Nikonenko *et al.*, 2008; Yoshihara *et al.*, 2009), donde la disminución de la disponibilidad de ON en el NAC luego de la interrupción de la administración de DZ podría explicar en parte estos resultados. En conjunto, estos hallazgos indican que tanto el aumento de la transmisión sináptica en el

HP podría potenciar la inhibición GABAérgica en el NAc, produciendo una disminución de la excitabilidad de las MSN, como la inhibición del NAc podría contribuir con el aumento de la plasticidad sináptica hipocampal. La neurotransmisión nitrérgica parecería tener un rol preponderante en los cambios observados en ambas estructuras. Sin embargo, la complejidad del circuito involucrado en la dependencia a DZ y los experimentos realizados en este trabajo no permiten establecer una relación directa entre la funcionalidad de ambas estructuras, ni descartar la participación de otras áreas cerebrales involucradas en este fenómeno.

CONCLUSIONES FINALES:

Los resultados presentados en esta tesis indican que la IL podría ser una estrategia no farmacológica útil para prevenir la expresión de “ansiedad” como síntoma característico del síndrome de abstinencia de BZDs cuando se pueda diseñar adecuadamente para humanos, como se demostró para el tratamiento de otras patologías dependientes del contexto (Hall *et al.*, 2016). En este sentido, los resultados obtenidos apoyan la utilidad de modelos traslacionales como enfoques pre-clínicos para patologías humanas. De esta forma se confirma la primera parte de la hipótesis la cual postula que, *“la interferencia del proceso de aprendizaje asociativo que subyace al desarrollo de dependencia a DZ puede revertir los cambios plásticos dependientes del ON en el HP evitando la expresión de un comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ”*, ya que el protocolo de IL fue capaz de evitar la expresión del comportamiento de “tipo ansioso” durante la abstinencia a DZ. Además, la IL pudo inducir cambios funcionales y moleculares en el HP, como la normalización de la transmisión sináptica y la reducción de la expresión de NOS-1. También, se puede confirmar que estos procesos son dependientes de ON ya que la inhibición farmacológica de NOS-1 fue capaz de reproducir los cambios conductuales y plásticos en el HP observados con la IL. Teniendo en cuenta que recientemente se ha descrito que la señalización de ON en el HP es crucial para el desarrollo y expresión de la sensibilización al efecto hiperlocomotor de cocaína (Artur de la Villarmois *et al.*, 2019), sería interesante estudiar el efecto de la administración de 7-NI (inhibidor selectivo de NOS-1) de

manera intra-hipocampal para confirmar la participación de esta estructura en la expresión de “ansiedad” característica del síndrome de abstinencia a DZ y de la plasticidad sináptica asociada mediante un mecanismo dependiente de ON. De esta manera, se podría proponer a la vía del ON en el HP como un blanco terapéutico en común para prevenir o reducir la susceptibilidad a la recaída de distintas sustancias adictivas.

Por último, el final de este trabajo de tesis estuvo dirigido a caracterizar adaptaciones moleculares y plásticas relacionadas con la expresión de la abstinencia a DZ, luego de su administración crónica, en el NAc. Aquí, verificamos la segunda parte de la hipótesis que postula que *“debido a la participación del NAc en los efectos reforzantes de las BZDs, la abstinencia a DZ induce cambios en la plasticidad celular y en la transmisión nitrérgica en esta estructura”*, ya que se observó que aquellos animales que expresaron un comportamiento de “tipo ansioso” luego del tratamiento crónico con DZ presentaron una disminución en la plasticidad funcional y estructural en las principales células del NAc (MSN), además se caracterizó que este grupo de animales “ansiosos” presentaron una disminución en la expresión y actividad de NOS-1. Estos resultados describen por primera vez el impacto de la administración crónica de DZ o de la expresión de abstinencia sobre alteraciones funcionales, anatómicas y moleculares en el NAc.

Finalmente es posible destacar que un aspecto central del desarrollo de dependencia, a pesar de la importancia de los numerosos factores psicosociales, es que implica un proceso biológico. Sin embargo, llama la atención que la mayoría de las formas de plasticidad relacionadas con la adicción son muy similares y comparten las mismas regiones del cerebro, que los tipos de plasticidad que se han asociado con las formas más clásicas de conductas que evidencian procesos de aprendizaje y memoria, lo que refleja tal vez el repertorio limitado de los mecanismos de adaptación del que disponen las neuronas cuando se enfrentan con las exigencias del medio ambiente (Nestler, 2013). En este sentido, los resultados de este trabajo caracterizan algunas adaptaciones moleculares y celulares que ocurren en regiones específicas del cerebro y que median alteraciones conductuales asociadas con

la dependencia a DZ, verificando mecanismos homólogos con otros psicofármacos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA:**A**

- Ahmed, T. & Frey, J.U. (2005) Plasticity-specific phosphorylation of CaMKII, MAP-kinases and CREB during late-LTP in rat hippocampal slices in vitro. *Neuropharmacology*, 49, 477-492.
- Almiron, R.S. & Ramirez, O.A. (2005) Participation of dorsal raphe nucleus in the behavioral alteration observed after discontinuation of chronic diazepam administration: possible neural circuitry involved. *Synapse*, 56, 61-68.
- Almiron, R.S., Perez, M.F. & Ramirez, O.A. (2004) MK-801 prevents the increased NMDA-NR1 and NR2B subunits mRNA expression observed in the hippocampus of rats tolerant to diazepam. *Brain Res*, 1008, 54-60.
- Amaral, D.G., Dolorfo, C. & Alvarez-Royo, P. (1991) Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus*, 1, 415-435.
- Artur de la Villarmois, E., Gabach, L.A., Bianconi, S., Poretti, M.B., Occhieppo, V., Schioth, H.B., Carlini, V.P. & Perez, M.F. (2019) Pharmacological NOS-1 Inhibition Within the Hippocampus Prevented Expression of Cocaine Sensitization: Correlation with Reduced Synaptic Transmission. *Mol Neurobiol*.
- Ayesta, F.J., Rodríguez M., & Santamaría, J. (2008). Farmacodependencias. En J. Flórez. (5ª Ed.), *Farmacología Humana* (pp. 663- 690). Elseiver.
- Azad, S.C., Marsicano, G., Eberlein, I., Putzke, J., Zieglgansberger, W., Spanagel, R. & Lutz, B. (2001) Differential role of the nitric oxide pathway on delta(9)-THC-induced central nervous system effects in the mouse. *Eur J Neurosci*, 13, 561-568.

B

- Baillargeon, L., Landreville, P., Verreault, R., Beauchemin, J.P., Gregoire, J.P. & Morin, C.M. (2003) Discontinuation of benzodiazepines among older insomniac adults treated with cognitive-behavioural therapy combined with gradual tapering: a randomized trial. *Cmaj*, 169, 1015-1020.
- Bajo, M., Crawford, E.F., Roberto, M., Madamba, S.G. & Siggins, G.R. (2006) Chronic morphine treatment alters expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the extended amygdala. *J Neurosci Res*, 83, 532-537.
- Bi, G.Q. & Poo, M.M. (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci*, 18, 10464-10472.
- Black, Y.D., Green-Jordan, K., Eichenbaum, H.B. & Kantak, K.M. (2004) Hippocampal memory system function and the regulation of cocaine self-administration behavior in rats. *Behav Brain Res*, 151, 225-238.

- Blanco, C., Alderson, D., Ogburn, E., Grant, B.F., Nunes, E.V., Hatzenbuehler, M.L. & Hasin, D.S. (2007) Changes in the prevalence of non-medical prescription drug use and drug use disorders in the United States: 1991-1992 and 2001-2002. *Drug and alcohol dependence*, 90, 252-260.
- Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Bliss, T.V. & Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232, 331-356.
- Bon, C.L. & Garthwaite, J. (2003) On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci*, 23, 1941-1948.
- Bouton, M.E. (2002) Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry*, 52, 976-986.
- Bredt, D.S. & Snyder, S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, 63, 175-195.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M. & Snyder, S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347, 768-770.
- Brenman, J.E. & Bredt, D.S. (1997) Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr Opin Neurobiol*, 7, 374-378.
- Brog, J.S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y. & Zahm, D.S. (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*, 338, 255-278.
- Bruckdorfer, R. (2005) The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*, 26, 3-31.
- Buga, G.M., Singh, R., Pervin, S., Rogers, N.E., Schmitz, D.A., Jenkinson, C.P., Cederbaum, S.D. & Ignarro, L.J. (1996) Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol*, 271, H1988-1998.
- Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R.J., Schmidt, H.H. & Valtschanoff, J.G. (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci*, 22, 8961-8970.

C

- Caballero, A. & Tseng, K.Y. (2016) GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. *Trends Neurosci*, 39, 441-448.
- CADTH (2015). Discontinuation strategies for patients with long-term benzodiazepine use: A review of clinical evidence and guidelines. In Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (Ed.), CADTH rapid response reports (pp. 2–18). Ottawa, ON: Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health.

- Center for Behavioral Health Statistics and Quality. (2018). Results from the 2017 national survey on drug use and health: detailed tables. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Rockville, MD.
- Chen, B.T., Yau, H.J., Hatch, C., Kusumoto-Yoshida, I., Cho, S.L., Hopf, F.W. & Bonci, A. (2013) Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature*, 496, 359-362.
- Cheng, V.Y., Martin, L.J., Elliott, E.M., Kim, J.H., Mount, H.T., Taverna, F.A., Roder, J.C., Macdonald, J.F., Bhambri, A., Collinson, N., Wafford, K.A. & Orser, B.A. (2006) Alpha5GABAA receptors mediate the amnestic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J Neurosci*, 26, 3713-3720.
- Clarkson, R.B., Norby, S.W., Smirnov, A., Boyer, S., Vahidi, N., Nims, R.W. & Wink, D.A. (1995) Direct measurement of the accumulation and mitochondrial conversion of nitric oxide within Chinese hamster ovary cells using an intracellular electron paramagnetic resonance technique. *Biochim Biophys Acta*, 1243, 496-502.
- Collinson, N., Kuenzi, F.M., Jarolimek, W., Maubach, K.A., Cothliff, R., Sur, C., Smith, A., Otu, F.M., Howell, O., Atack, J.R., McKernan, R.M., Seabrook, G.R., Dawson, G.R., Whiting, P.J. & Rosahl, T.W. (2002) Enhanced learning and memory and altered GABAergic synaptic transmission in mice lacking the alpha 5 subunit of the GABAA receptor. *J Neurosci*, 22, 5572-5580.
- Crestani, F., Keist, R., Fritschy, J.M., Benke, D., Vogt, K., Prut, L., Bluthmann, H., Mohler, H. & Rudolph, U. (2002) Trace fear conditioning involves hippocampal alpha5 GABA(A) receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8980-8985.
- Crestani, F., Low, K., Keist, R., Mandelli, M., Mohler, H. & Rudolph, U. (2001) Molecular targets for the myorelaxant action of diazepam. *Mol Pharmacol*, 59, 442-445.

D

- D'Ambrosio, R., Gordon, D.S. & Winn, H.R. (2002) Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K(+) in rat hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 87, 87-102.
- De Blas, A.L. (1996) Brain GABAA receptors studied with subunit-specific antibodies. *Mol Neurobiol*, 12, 55-71.
- del Olmo, N., Miguens, M., Higuera-Matas, A., Torres, I., Garcia-Lecumberri, C., Solis, J.M. & Ambrosio, E. (2006) Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behavior. *Brain Res*, 1116, 120-126.
- Dickinson, B., Rush, P.A. & Radcliffe, A.B. (1990) Alprazolam use and dependence. A retrospective analysis of 30 cases of withdrawal. *West J Med*, 152, 604-608.

E

- Edelman, G.M. & Gally, J.A. (1992) Nitric oxide: linking space and time in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 11651-11652.
- Eisch, A.J. & Mandyam, C.D. (2004) Drug dependence and addiction, II: Adult neurogenesis and drug abuse. *The American journal of psychiatry*, 161, 426.
- Enoch, M.A. & Goldman, D. (2001) The genetics of alcoholism and alcohol abuse. *Current psychiatry reports*, 3, 144-151.
- Esplugues, J.V. (2002) NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol*, 135, 1079-1095.

F

- Fang, S.Y., Chen, C.Y., Chang, I.S., Wu, E.C., Chang, C.M. & Lin, K.M. (2009) Predictors of the incidence and discontinuation of long-term use of benzodiazepines: a population-based study. *Drug and alcohol dependence*, 104, 140-146.
- Fanselow, M.S. & Dong, H.W. (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65, 7-19.
- Faria, M.S., Muscara, M.N., Moreno Junior, H., Teixeira, S.A., Dias, H.B., De Oliveira, B., Graeff, F.G. & De Nucci, G. (1997) Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. *Eur J Pharmacol*, 323, 37-43.
- Floresco, S.B. (2015) The nucleus accumbens: an interface between cognition, emotion, and action. *Annu Rev Psychol*, 66, 25-52.
- Foley, D.L., Goldston, D.B., Costello, E.J. & Angold, A. (2006) Proximal Psychiatric Risk Factors for Suicidality in Youth: The Great Smoky Mountains Study. *JAMA psychiatry*, 63, 1017-1024.
- Fontanesi, L.B., Ferreira, R., Cabral, A., Castilho, V.M., Brandao, M.L. & Nobre, M.J. (2007) Brainstem areas activated by diazepam withdrawal as measured by Fos-protein immunoreactivity in rats. *Brain Res*, 1166, 35-46.
- French, S.J. & Totterdell, S. (2002) Hippocampal and prefrontal cortical inputs monosynaptically converge with individual projection neurons of the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*, 446, 151-165.
- Friedman, H., Abernethy, D.R., Greenblatt, D.J. & Shader, R.I. (1986) The pharmacokinetics of diazepam and desmethyldiazepam in rat brain and plasma. *Psychopharmacology (Berl)*, 88, 267-270.

G

- Gabach, L.A., Carlini, V.P., Monti, M.C., Maglio, L.E., De Barioglio, S.R. & Perez, M.F. (2013) Involvement of nNOS/NO/sGC/cGMP signaling pathway in cocaine sensitization and in the associated hippocampal

alterations: does phosphodiesterase 5 inhibition help to drug vulnerability?
Psychopharmacology (Berl), 229, 41-50.

Gabra, B.H., Afify, E.A., Daabees, T.T. & Abou Zeit-Har, M.S. (2005) The role of the NO/NMDA pathways in the development of morphine withdrawal induced by naloxone in vitro. *Pharmacol Res*, 51, 319-327.

Garthwaite, J. & Boulton, C.L. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 57, 683-706.

Garthwaite, J. (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci*, 27, 2783-2802.

Garthwaite, J. (2010) New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem*, 334, 221-232.

Goldman, D., Oroszi, G. & Ducci, F. (2005) The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat Rev Genet*, 6, 521-532.

Griffiths, R.R. & Weerts, E.M. (1997) Benzodiazepine self-administration in humans and laboratory animals--implications for problems of long-term use and abuse. *Psychopharmacology (Berl)*, 134, 1-37.

Groenewegen, H.J., Wright, C.I., Beijer, A.V. & Voorn, P. (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 49-63.

Guerrini, G. & Ciciani, G. (2013) Benzodiazepine receptor ligands: a patent review (2006-2012). *Expert Opin Ther Pat*, 23, 843-866.

Guix, F.X., Uribesalgo, I., Coma, M. & Munoz, F.J. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol*, 76, 126-152.

H

Hall, G., Stockhorst, U., Enck, P. & Klosterhalfen, S. (2016) Overshadowing and latent inhibition in nausea-based context conditioning in humans: Theoretical and practical implications. *Q J Exp Psychol (Hove)*, 69, 1227-1238.

Han, Y. & Lu, L. (2016) The Other Face of the Nucleus Accumbens: Aversion. *Neurosci Bull*, 32, 569-571.

Heneka, M.T. & Feinstein, D.L. (2001) Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol*, 114, 8-18.

Himmerich, H., Nickel, T., Dalal, M.A. & Muller, M.B. (2007) [Gabapentin treatment in a female patient with panic disorder and adverse effects under carbamazepine during benzodiazepine withdrawal]. *Psychiatr Prax*, 34, 93-94.

Hu, X., Oroszi, G., Chun, J., Smith, T.L., Goldman, D. & Schuckit, M.A. (2005) An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. *Alcohol Clin Exp Res*, 29, 8-16.

- Hu, X.T., Basu, S. & White, F.J. (2004) Repeated cocaine administration suppresses HVA-Ca²⁺ potentials and enhances activity of K⁺ channels in rat nucleus accumbens neurons. *Journal of neurophysiology*, 92, 1597-1607.
- Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H. & Fishman, M.C. (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, 75, 1273-1286.
- Hurlé, M.A., Monti, J. & Flórez, J. (2008). Fármacos ansiolíticos y sedantes. Farmacología de los trastornos del sueño. En J. Flórez. (5ª Ed.), Farmacología Humana (pp. 543-566). Elseiver.
- Hyman, S.E. & Malenka, R.C. (2001) Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci*, 2, 695-703.

I

- Itzhak, Y., Anderson, K.L. & Ali, S.F. (2004) Differential response of nNOS knockout mice to MDMA ("ecstasy")- and methamphetamine-induced psychomotor sensitization and neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*, 1025, 119-128.
- Iwata, N., Cowley, D.S., Radel, M., Roy-Byrne, P.P. & Goldman, D. (1999) Relationship between a GABAA alpha 6 Pro385Ser substitution and benzodiazepine sensitivity. *The American journal of psychiatry*, 156, 1447-1449.
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1995) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of learning and memory*, 63, 19-32.
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*, 68, 285-316.

J

- Jacob, T.C., Moss, S.J. & Jurd, R. (2008) GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*, 9, 331-343.
- Jacobson, C.M., Muehlenkamp, J.J., Miller, A.L. & Turner, J.B. (2008) Psychiatric Impairment Among Adolescents Engaging in Different Types of Deliberate Self-Harm. *Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology*, 37, 363-375.
- Jain, R., Mukherjee, K. & Mohan, D. (2008) Effects of nitric oxide synthase inhibitors in attenuating nicotine withdrawal in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 88, 473-480.
- Jentsch, J.D. & Taylor, J.R. (1999) Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*, 146, 373-390.

Johnson, S.W. & North, R.A. (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*, 12, 483-488.

Jones, C.M. & McAninch, J.K. (2015) Emergency Department Visits and Overdose Deaths From Combined Use of Opioids and Benzodiazepines. *Am J Prev Med*, 49, 493-501.

K

Kalivas, P.W. (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci*, 10, 561-572.

Kaputlu, I. & Uzbay, T. (1997) L-NAME inhibits pentylentetrazole and strychnine-induced seizures in mice. *Brain Res*, 753, 98-101.

Karschin, C., Dissmann, E., Stuhmer, W. & Karschin, A. (1996) IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K⁺ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci*, 16, 3559-3570.

Kato, H., Narita, M., Suzuki, M., Yoshimoto, K., Yasuhara, M. & Suzuki, T. (2007) Role of tyrosine kinase-dependent phosphorylation of NR2B subunit-containing NMDA receptor in morphine reward. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 42, 13-20.

Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Augood, S.J. & Emson, P.C. (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci*, 18, 527-535.

Kayir, H. & Uzbay, I.T. (2004) Evidence for the role of nitric oxide in caffeine-induced locomotor activity in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 172, 11-15.

Kelley, A.E. & Domesick, V.B. (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience*, 7, 2321-2335.

Kelley, A.E. (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*, 44, 161-179.

Kelly, M.T., Yao, Y., Sondhi, R. & Sacktor, T.C. (2007) Actin polymerization regulates the synthesis of PKMzeta in LTP. *Neuropharmacology*, 52, 41-45.

Kessler, R.C., Petukhova, M., Sampson, N.A., Zaslavsky, A.M. & Wittchen, H.-U. (2012) Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, 21, 169-184.

Kim, J.J. & Fanselow, M.S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*, 256, 675-677.

Kiss, J.P. & Vizi, E.S. (2001) Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends Neurosci*, 24, 211-215.

Knierim, J.J. (2015) The hippocampus. *Current biology : CB*, 25, R1116-1121.

- Knowles, R.G. & Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 298 (Pt 2), 249-258.
- Koht, A. & Moss, J.I. (1997) Does midazolam cause retrograde amnesia, and can flumazenil reverse that amnesia? *Anesth Analg*, 85, 211-212.
- Kutlu, M.G. & Gould, T.J. (2016) Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction. *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.), 23, 515-533.

L

- Lader, M. (1994) Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur Neuropsychopharmacol*, 4, 85-91.
- Lagnaoui, R., Depont, F., Fourrier, A., Abouelfath, A., Begaud, B., Verdoux, H. & Moore, N. (2004) Patterns and correlates of benzodiazepine use in the French general population. *European journal of clinical pharmacology*, 60, 523-529.
- Lalive, A.L., Rudolph, U., Luscher, C. & Tan, K.R. (2011) Is there a way to curb benzodiazepine addiction? *Swiss Med Wkly*, 141, w13277.
- Lancaster, J.R., Jr. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 8137-8141.
- LeGates, T.A., Kvarita, M.D., Tooley, J.R., Francis, T.C., Lobo, M.K., Creed, M.C. & Thompson, S.M. (2018) Reward behaviour is regulated by the strength of hippocampus-nucleus accumbens synapses. *Nature*, 564, 258-262.
- Liddie, S., Balda, M.A. & Itzhak, Y. (2013) Nitric oxide (NO) signaling as a potential therapeutic modality against psychostimulants. *Curr Pharm Des*, 19, 7092-7102.
- Lopez, J., Almaguer, W., Perez, H., Frey, J.U. & Bergado, J.A. (2008) Opposite effects of shell or core stimulation of the nucleus accumbens on long-term potentiation in dentate gyrus of anesthetized rats. *Neuroscience*, 151, 572-578.

M

- Ma, Y.Y., Chu, N.N., Guo, C.Y., Han, J.S. & Cui, C.L. (2007) NR2B-containing NMDA receptor is required for morphine-but not stress-induced reinstatement. *Exp Neurol*, 203, 309-319.
- Maaske L., (2016) Brain Anatomy & Illustration: Metaphors in Medicine. *Medimagery Medical Illustration*. Recuperado de: <http://medimagery.com/metaphors-in-medicine/>
- MacKenzie, G.M., Rose, S., Bland-Ward, P.A., Moore, P.K., Jenner, P. & Marsden, C.D. (1994) Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro indazole. *Neuroreport*, 5, 1993-1996.

- Maren, S. (2008) Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci*, 28, 1661-1666.
- Marin, R.H., Perez, M.F., Duero, D.G. & Ramirez, O.A. (1999) Preexposure to drug administration context blocks the development of tolerance to sedative effects of diazepam. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 64, 473-477.
- Martin, S.J. & Morris, R.G. (2002) New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*, 12, 609-636.
- Martin, S.J., Grimwood, P.D. & Morris, R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annual review of neuroscience*, 23, 649-711.
- Maskos, U., Molles, B.E., Pons, S., Besson, M., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Evrard, A., Cazala, P., Cormier, A., Mameli-Engvall, M., Dufour, N., Cloez-Tayarani, I., Bemelmans, A.P., Mallet, J., Gardier, A.M., David, V., Faure, P., Granon, S. & Changeux, J.P. (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, 436, 103-107.
- Maust, D.T., Lin, L.A. & Blow, F.C. (2019) Benzodiazepine Use and Misuse Among Adults in the United States. *Psychiatric services*, 70, 97-106.
- McEwen, B.S. (2000) Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol Psychiatry*, 48, 721-731.
- McFarland, K. & Kalivas, P.W. (2001) The circuitry mediating cocaine-induced reinstatement of drug-seeking behavior. *J Neurosci*, 21, 8655-8663.
- McKernan, R.M., Rosahl, T.W., Reynolds, D.S., Sur, C., Wafford, K.A., Atack, J.R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K.W., Carling, R.W., Street, L.J., Castro, J.L., Ragan, C.I., Dawson, G.R. & Whiting, P.J. (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci*, 3, 587-592.
- Merikangas, K.R., He, J.-p., Burstein, M., Swanson, S.A., Avenevoli, S., Cui, L., Benjet, C., Georgiades, K. & Swendsen, J. (2010) Lifetime Prevalence of Mental Disorders in U.S. Adolescents: Results from the National Comorbidity Survey Replication–Adolescent Supplement (NCS-A). *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 49, 980-989.
- Merikangas, K.R., Mehta, R.L., Molnar, B.E., Walters, E.E., Swendsen, J.D., Aguilar-Gaziola, S., Bijl, R., Borges, G., Caraveo-Anduaga, J.J., DeWit, D.J., Kolody, B., Vega, W.A., Wittchen, H.U. & Kessler, R.C. (1998) Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addict Behav*, 23, 893-907.
- Messaoudi, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dageyte, G., da Silva, B. & Bramham, C.R. (2007) Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term

potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*, 27, 10445-10455.

Mogenson, G.J., Swanson, L.W. & Wu, M. (1983) Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *J Neurosci*, 3, 189-202.

Molina, J.A., Leza, J.C., Ortiz, S., Moro, M.A., Perez, S., Lizasoain, I., Uriguen, L., Oliva, J.M. & Manzanares, J. (2002) Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of nitric oxide metabolites are increased in dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*, 333, 151-153.

Monti, M.C., Almirón, R.S., Bignante, E.A. & Ramirez, O.A. (2010) Changes in hippocampal arc protein expression and synaptic plasticity by the presentation of contextual cues linked to drug experience. *Synapse*, 64, 39-46.

Monti, M.C., Gabach, L.A., Perez, M.F. & Ramirez, O.A. (2012) Impact of contextual cues in the expression of the memory associated with diazepam withdrawal: involvement of hippocampal PKMzeta in vivo, and Arc expression and LTP in vitro. *Eur J Neurosci*, 36, 3118-3125.

Moore, P.K., Babbedge, R.C., Wallace, P., Gaffen, Z.A. & Hart, S.L. (1993) 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits antinociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol*, 108, 296-297.

Moore, P.K., Oluyomi, A.O., Babbedge, R.C., Wallace, P. & Hart, S.L. (1991) L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br J Pharmacol*, 102, 198-202.

Morin, C.M., Bastien, C., Guay, B., Radouco-Thomas, M., Leblanc, J. & Vallieres, A. (2004) Randomized clinical trial of supervised tapering and cognitive behavior therapy to facilitate benzodiazepine discontinuation in older adults with chronic insomnia. *The American journal of psychiatry*, 161, 332-342.

Morley, J.E. & Flood, J.F. (1991) Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci*, 49, 707-711.

Mulder, A.B., Hodenpijl, M.G. & Lopes da Silva, F.H. (1998) Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci*, 18, 5095-5102.

Mustafa, A.K., Gadalla, M.M. & Snyder, S.H. (2009) Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal*, 2, re2.

N

Naloto, D.C., Lopes, F.C., Barberato Filho, S., Lopes, L.C., Del Fiol Fde, S. & Bergamaschi Cde, C. (2016) Prescription of benzodiazepines for adults and older adults from a mental health clinic. *Cien Saude Colet*, 21, 1267-1276.

- Nasif, F.J., Hu, X.T., Ramirez, O.A. & Perez, M.F. (2011) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents alterations in medial prefrontal cortex excitability induced by repeated cocaine administration. *Psychopharmacology (Berl)*, 218, 323-330.
- Nestler, E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*, 2, 119-128.
- Nestler, E.J. (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiology of learning and memory*, 78, 637-647.
- Nestler, E.J. (2013) Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues Clin Neurosci*, 15, 431-443.
- Nicoll, R.A. & Malenka, R.C. (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 377, 115-118.
- NIDA (2015) Drug use trends remain stable or decline among teens. In Abuse, N.I.o.D. (ed).
- Nikonenko, I., Boda, B., Steen, S., Knott, G., Welker, E. & Muller, D. (2008) PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling. *J Cell Biol*, 183, 1115-1127.
- Nisenbaum, E.S. & Wilson, C.J. (1995) Potassium currents responsible for inward and outward rectification in rat neostriatal spiny projection neurons. *J Neurosci*, 15, 4449-4463.
- Nothdurfter, C., Rupprecht, R. & Rammes, G. (2012) Recent developments in potential anxiolytic agents targeting GABAA/BzR complex or the translocator protein (18kDa) (TSPO). *Curr Top Med Chem*, 12, 360-370.
- O**
- O'Brien, C.P., Childress, A.R., McLellan, A.T. & Ehrman, R. (1992) Classical conditioning in drug-dependent humans. *Ann N Y Acad Sci*, 654, 400-415.
- O'Connor, K., Marchand, A., Brousseau, L., Aardema, F., Mainguy, N., Landry, P., Savard, P., Leveille, C., Lafrance, V., Boivin, S., Pitre, D., Robillard, S. & Bouthillier, D. (2008) Cognitive-behavioural, pharmacological and psychosocial predictors of outcome during tapered discontinuation of benzodiazepine. *Clin Psychol Psychother*, 15, 1-14.
- Olfson, M., King, M. & Schoenbaum, M. (2015) Benzodiazepine use in the United States. *JAMA psychiatry*, 72, 136-142.
- OMS. Organización Mundial de la Salud. (1994) Glosario de términos de alcohol y drogas. Gobierno de España, Ministerio de sanidad y consumo. Recuperado de: www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf

P

- Park, J.H., Straub, V.A. & O'Shea, M. (1998) Anterograde signaling by nitric oxide: characterization and in vitro reconstitution of an identified nitrenergic synapse. *J Neurosci*, 18, 5463-5476.
- Pavlov, I.P. (1927) *Conditioned reflexes*. Oxford University Press, London.
- Pellow, S. & File, S.E. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 24, 525-529.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. & Briley, M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 14, 149-167.
- Perez, M.F., Ford, K.A., Goussakov, I., Stutzmann, G.E. & Hu, X.T. (2011) Repeated cocaine exposure decreases dopamine D(2)-like receptor modulation of Ca(2+) homeostasis in rat nucleus accumbens neurons. *Synapse*, 65, 168-180.
- Perez, M.F., Gabach, L.A., Almiron, R.S., Carlini, V.P., De Barioglio, S.R. & Ramirez, O.A. (2010) Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior. *Synapse*, 64, 742-753.
- Perez, M.F., Maglio, L.E., Marchesini, G.R., Molina, J.C. & Ramirez, O.A. (2002) Environmental changes modify the expression of Diazepam withdrawal. *Behav Brain Res*, 136, 75-81.
- Perez, M.F., Nasif, F.J., Marchesini, G.R., Maglio, L.E. & Ramirez, O.A. (2001) Hippocampus and locus coeruleus activity on rats chronically treated with diazepam. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 69, 431-438.
- Phillips, R.G. & LeDoux, J.E. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, 106, 274-285.
- Podhorna, J. (2002) The experimental pharmacotherapy of benzodiazepine withdrawal. *Curr Pharm Des*, 8, 23-43.
- Prast, H. & Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*, 64, 51-68.
- Prescott, C.A. & Kendler, K.S. (1999) Genetic and environmental contributions to alcohol abuse and dependence in a population-based sample of male twins. *The American journal of psychiatry*, 156, 34-40.
- Preville, M., Bosse, C., Vasiliadis, H.M., Voyer, P., Laurier, C., Berbiche, D., Perodeau, G., Grenier, S., Beland, S.G., Dionne, P.A., Gentil, L. & Moride, Y. (2012) Correlates of potentially inappropriate prescriptions of benzodiazepines among older adults: results from the ESA study. *Can J Aging*, 31, 313-322.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., McNamara, J., Williams, S. (2004). Plasticity of Mature Synapses and Circuits. In

Neuroscience. (3° Ed.) (pp. 575-610). Massachusetts, U.S.A. Sinauer Associates, Inc.

Q

Quaglio, G., Pattaro, C., Gerra, G., Mathewson, S., Verbanck, P., Des Jarlais, D.C. & Lugoboni, F. (2012) High dose benzodiazepine dependence: description of 29 patients treated with flumazenil infusion and stabilised with clonazepam. *Psychiatry Res*, 198, 457-462.

Quock, R.M. & Nguyen, E. (1992) Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sci*, 51, PL255-260.

R

Ramirez, O.A. & Perez, M.F. (2009) The plastic phenomenon underlying the associative processes in the addictive properties of diazepam and other psychoactive drugs. *Mini Rev Med Chem*, 9, 869-877.

Rang, H.P., Dale, M. M., Ritter J.M., Flower R.J. (2008). Farmacología sexta edición (pp. 535- 544). Barcelona, España: Elsevier España.

Rawls, S.M., Rodriguez, T., Baron, D.A. & Raffa, R.B. (2006) A nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) attenuates abstinence-induced withdrawal from both cocaine and a cannabinoid agonist (WIN 55212-2) in Planaria. *Brain Res*, 1099, 82-87.

Reznikov, K. (1975) [Local proliferation of cells of the granular layer of the dentate gyrus of the mouse hippocampus during postnatal ontogenesis and following brain injury]. *Ontogenez*, 6, 242-250.

Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 228-236.

Rudd, R.A., Aleshire, N., Zibbell, J.E. & Gladden, R.M. (2016) Increases in Drug and Opioid Overdose Deaths--United States, 2000-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64, 1378-1382.

Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.M., Martin, J.R., Bluethmann, H. & Mohler, H. (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, 401, 796-800.

Russwurm, M., Wittau, N. & Koesling, D. (2001) Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *J Biol Chem*, 276, 44647-44652.

S

Salter, M., Duffy, C., Garthwaite, J. & Strijbos, P.J. (1996) Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *J Neurochem*, 66, 1683-1690.

Scholl, L., Seth, P., Kariisa, M., Wilson, N. & Baldwin, G. (2018) Drug and Opioid-Involved Overdose Deaths - United States, 2013-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 67, 1419-1427.

- Schuckit, M.A., Mazzanti, C., Smith, T.L., Ahmed, U., Radel, M., Iwata, N. & Goldman, D. (1999) Selective genotyping for the role of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and GABA alpha 6 receptors and the serotonin transporter in the level of response to alcohol: a pilot study. *Biol Psychiatry*, 45, 647-651.
- Schweizer, E., Rickels, K., Case, W.G. & Greenblatt, D.J. (1990) Long-term therapeutic use of benzodiazepines. II. Effects of gradual taper. *Arch Gen Psychiatry*, 47, 908-915.
- Scofield, M.D., Heinsbroek, J.A., Gipson, C.D., Kupchik, Y.M., Spencer, S., Smith, A.C., Roberts-Wolfe, D. & Kalivas, P.W. (2016) The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol Rev*, 68, 816-871.
- SEDROFARMA. Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina. (2017) Consumo de Psicofármacos. Estudio nacional en población de 12 a 65 años sobre consumo de sustancias psicoactivas. Argentina, 2017. Recuperado de: www.observatorio.gov.ar/index.php/epidemiologia/item/16-estudios-de-poblacion-general
- Sequeira, S.M., Ambrosio, A.F., Malva, J.O., Carvalho, A.P. & Carvalho, C.M. (1997) Modulation of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes by nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1, 315-329.
- Serrano, P., Yao, Y. & Sacktor, T.C. (2005) Persistent phosphorylation by protein kinase Mzeta maintains late-phase long-term potentiation. *J Neurosci*, 25, 1979-1984.
- Sesack, S.R. & Grace, A.A. (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35, 27-47.
- Shen, G., Mohamed, M.S., Das, P. & Tietz, E.I. (2009) Positive allosteric activation of GABA_A receptors bi-directionally modulates hippocampal glutamate plasticity and behaviour. *Biochem Soc Trans*, 37, 1394-1398.
- Sholl, D.A. (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87, 387-406.
- Siegel, S. (1975) Evidence from rats that morphine tolerance is a learned response. *J Comp Physiol Psychol*, 89, 498-506.
- Siegel, S. (1977) Morphine tolerance acquisition as an associative process. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, 3, 1-13.
- Stamler, J.S., Lamas, S. & Fang, F.C. (2001) Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 106, 675-683.
- Stephens, D.N. (1995) A glutamatergic hypothesis of drug dependence: extrapolations from benzodiazepine receptor ligands. *Behav Pharmacol*, 6, 425-446.
- Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (2013). Drug Abuse Warning Network, 2011: National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. (Publication No. (SMA) 13-4760). Recuperado de <http://www.samhsa.gov/data/>

Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W. & Galli, A. (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol*, 75, 406-433.

Szabo, B., Siemes, S. & Wallmichrath, I. (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. *Eur J Neurosci*, 15, 2057-2061.

T

Talarek, S., Listos, J. & Fidecka, S. (2011) Effect of nitric oxide synthase inhibitors on benzodiazepine withdrawal in mice and rats. *Pharmacol Rep*, 63, 680-689.

Tan, K.R., Brown, M., Labouebe, G., Yvon, C., Creton, C., Fritschy, J.M., Rudolph, U. & Luscher, C. (2010) Neural bases for addictive properties of benzodiazepines. *Nature*, 463, 769-774.

Tan, K.R., Rudolph, U. & Luscher, C. (2011) Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci*, 34, 188-197.

Taubenfeld, S.M., Muravieva, E.V., Garcia-Osta, A. & Alberini, C.M. (2010) Disrupting the memory of places induced by drugs of abuse weakens motivational withdrawal in a context-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 12345-12350.

Tayfun Uzbay, I. & Oglesby, M.W. (2001) Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 43-52.

Tepper, J.M., Tecuapetla, F., Koos, T. & Ibanez-Sandoval, O. (2010) Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Front Neuroanat*, 4, 150.

Teyler, T.J. & DiScenna, P. (1987) Long-term potentiation. *Annual review of neuroscience*, 10, 131-161.

Thompson, A.M., Swant, J., Gosnell, B.A. & Wagner, J.J. (2004) Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience*, 127, 177-185.

Tzingounis, A.V. & Nicoll, R.A. (2006) Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron*, 52, 403-407.

U

Uzbay, I.T., Erden, B.F., Tapanyigit, E.E. & Kayaalp, S.O. (1997) Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life Sci*, 61, 2197-2209.

V

Vaupel, D.B., Kimes, A.S. & London, E.D. (1995) Nitric oxide synthase inhibitors. Preclinical studies of potential use for treatment of opioid withdrawal. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 13, 315-322.

W

- Wagner, F.A. & Anthony, J.C. (2002) From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 26, 479-488.
- Wang, W.H. (1995) Regulation of the hyperpolarization-activated K⁺ channel in the lateral membrane of the cortical collecting duct. *J Gen Physiol*, 106, 25-43.
- Wasserman, E.A. & Miller, R.R. (1997) What's elementary about associative learning? *Annu Rev Psychol*, 48, 573-607.
- Wehry, A.M., Beesdo-Baum, K., Hennelly, M.M., Connolly, S.D. & Strawn, J.R. (2015) Assessment and treatment of anxiety disorders in children and adolescents. *Current psychiatry reports*, 17, 52.
- Welch, T.R., Rumack, B.H. & Hammond, K. (1977) Clonazepam overdose resulting in cyclic coma. *Clin Toxicol*, 10, 433-436.
- West, A.R. & Grace, A.A. (2004) The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci*, 24, 1924-1935.
- West, A.R., Galloway, M.P. & Grace, A.A. (2002) Regulation of striatal dopamine neurotransmission by nitric oxide: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44, 227-245.
- Wick, J.Y. (2013) The history of benzodiazepines. *Consult Pharm*, 28, 538-548.
- Wieland, H.A., Luddens, H. & Seeburg, P.H. (1992) A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem*, 267, 1426-1429.
- Wikler, A. (1973) Dynamics of drug dependence. Implications of a conditioning theory for research and treatment. *Arch Gen Psychiatry*, 28, 611-616.
- Wink, D.A., Grisham, M.B., Mitchell, J.B. & Ford, P.C. (1996) Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology. *Methods Enzymol*, 268, 12-31.
- Wolf, M.E. (2002) Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv*, 2, 146-157.
- Wolf, M.E., Sun, X., Mangiavacchi, S. & Chao, S.Z. (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 61-79.
- Woods, J.H., Katz, J.L. & Winger, G. (1987) Abuse liability of benzodiazepines. *Pharmacol Rev*, 39, 251-413.
- Woods, J.H., Katz, J.L. & Winger, G. (1992) Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol Rev*, 44, 151-347.

Y

Yates K, T. & Catril M, P. (2009) Tendencias en la utilización de benzodiazepinas en farmacia privada. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 47, 9-15.

Yoshihara, Y., De Roo, M. & Muller, D. (2009) Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol*, 19, 146-153.

Yun, H.Y., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (1996) Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol*, 10, 291-316.

Z

Zahm, D.S. & Brog, J.S. (1992) On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, 50, 751-767.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES:

Del presente trabajo de tesis surgieron las siguientes publicaciones:

Artur de la Villarmois E, Pérez MF. "Cognitive interference as a possible therapeutic strategy to prevent expression of benzodiazepine withdrawal". Eur J Neurosci. 2019 Jul 12. DOI: 10.1111/ejn.14515.

Artur de la Villarmois E, Constantin MF, Bregonzio C, Pérez MF. "Diazepam Withdrawal Expression is related to Hippocampal NOS-1 Upregulation". Arch Pharm Pharma Sci. 2018; 2: 001-009.

Received: 12 April 2019 | Revised: 1 July 2019 | Accepted: 5 July 2019
 DOI: 10.1111/ejn.14515

RESEARCH REPORT

EJN European Journal of Neuroscience FENS[®] WILEY

Cognitive interference as a possible therapeutic strategy to prevent expression of benzodiazepine withdrawal

Emilce Artur de la Villarmois | Mariela Fernanda Pérez 

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, IFEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

Correspondence

Mariela Fernanda Pérez, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, IFEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Haya de la Torre y Medina Allende s/n, 5000 Córdoba, Argentina.
 Email: mfperez@fcq.unc.edu.ar

Funding information

This study was supported by SECyT-Universidad Nacional de Córdoba [grant number 30720150100437CB, 2016-2017, and SECyT CONSOLIDAR 3, 2018-2021]. This funding agency had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/EJN.14515>

Abstract

Benzodiazepines are usually prescribed for anxiety and sleep disorders in long-term schedules that may cause drug dependence. Discontinuation after prolonged administration may lead to withdrawal expression, being anxiety the most predominant sign. The context-dependent associative learning process that underlies diazepam dependence can be interfered by pre-exposure to the drug administration context, an effect known as latent inhibition. Considering this background, the primary aim of the present investigation is to develop a therapeutic strategy to prevent diazepam withdrawal in male Wistar rats by interfering with this learning process. Nitric oxide is a crucial player in learning and memory, hippocampal synaptic transmission and in diazepam withdrawal. Then, a secondary goal is to determine how latent inhibition could alter functional plasticity and neuronal nitric oxide synthase (NOS-1) expression within the hippocampus, by using multi-unitary cell recordings and Western blot, respectively. Our results indicate that chronic diazepam treated animals under latent inhibition did not show anxiety, or changes in hippocampal synaptic transmission, but a significant reduction in NOS-1 expression was observed. Accordingly, pharmacological NOS-1 inhibition resembles behavioral and electrophysiological changes induced by latent inhibition. Contrary, diazepam treated animals under Control protocol expressed anxiety and evidenced an increased hippocampal-plasticity, without alterations in NOS-1 expression. In conclusion, manipulation of the contextual cues presented during diazepam administration may be considered as an effective non-pharmacological tool to prevent the withdrawal syndrome. This behavioral strategy may influence hippocampal synaptic transmission, probably by alterations in nitric oxide signaling pathways in this structure.

KEYWORDS

anxiety, diazepam, latent inhibition paradigm, long-term potentiation, neuronal nitric oxide synthase, nitric oxide

Abbreviations: %TA, percentage of time spent on the open arms; BZD, benzodiazepines; CR, conditioned response; CS, conditioned stimulus; DZ, diazepam; EPM, elevated plus-maze; EPSP, excitatory postsynaptic potentials; HP, hippocampus; i.p., intraperitoneal; LI, latent inhibition; LTP, long-term potentiation; NO, nitric oxide; NOS-1, neuronal nitric oxide synthase; OD, optical density; UR, unconditioned response; US, unconditioned stimulus; VEH, vehicle.

Edited by Paul Bolam.



Research Article

Diazepam Withdrawal Expression is related to Hippocampal NOS-1 Upregulation

Emilce Artur de la Villarmois, María Florencia Constantin, Claudia Bregonzio and Mariela Fernanda Pérez*

IFEC-Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende s/n, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

*Address for Correspondence: Mariela Fernanda Pérez, IFEC-Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende s/n, Ciudad Universitaria, 5000, Córdoba, Argentina, Email: mfperez@fcq.unc.edu.ar

Submitted: 23 December 2017

Approved: 05 January 2018

Published: 08 January 2018

Copyright: © 2018 Artur de la Villarmois E, et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Keywords: Diazepam; Withdrawal; NOS-1, Nitric oxide, Hippocampal plasticity

Abbreviations: BZD: Benzodiazepines; CR: Conditioned Response; CS: Conditioned Stimulus; DZ: Diazepam; EPM: Elevated Plus-Maze; EPSPs: Excitatory Postsynaptic Potentials; HP: Hippocampus; i.p: Intraperitoneal; LI: Latent Inhibition; LTP: Long-Term Potentiation; NMDA: N-Methyl-D-Aspartate; NO: Nitric Oxide; NOS-1: Neuronal Nitric Oxide Synthase; OD: Optical Density; %TA: percentage of Time spent on the open Arms; US: Unconditioned Stimulus; UR: Unconditioned Response; VEHIC: Vehicle

Abstract

Background: Benzodiazepines are usually prescribed for anxiety and sleep disorders in a long-term fashion that may cause drug dependence. Discontinuation after prolonged administration may lead to withdrawal expression, being anxiety the most predominant sign. It has been described that a context-dependent associative learning process underlies diazepam dependence. Nitric oxide is a crucial player in learning and memory processes, hippocampal transmission, as well as in benzodiazepines withdrawal. Considering that previous results from our laboratory showed an increase in hippocampal functional plasticity only in diazepam dependent rats, the aim of the present investigation is to determine whether diazepam dependence could alter neuronal nitric oxide synthase enzyme (NOS-1) expression within the hippocampus, by using western blot.

Results: chronic diazepam-treated animals that developed dependence showed increase in NOS-1 expression in dorsal, but not in ventral hippocampus, while no-dependent or control animals presented similar NOS-1 protein levels.

Conclusion: withdrawal from long-term diazepam exposure could be associated to increased nitric oxide neurotransmission within dorsal hippocampus induced by NOS-1 over-expression. This mechanism could underlie the improved hippocampal synaptic transmission previously observed in diazepam withdrawn animals. Confirmatory experiments need to be addressed to determine the mechanisms by which nitric oxide participates in benzodiazepines withdrawal in order find new molecular targets to develop pharmacological tools to prevent the withdrawal syndrome.

Introduction

Benzodiazepines are commonly prescribed for the treatment of anxiety and sleep disorders. However, prolonged treatment may lead to dependence with evident withdrawal syndrome [1-3]. Long-lasting neuroadaptations resulting from repeated drug exposure involve an associative learning process [4-7]. These learning and cognitive aspects of addiction suggest the existence of common neurobiological mechanisms mediating drug addiction and memory [5,8-10]. Both phenomena are accompanied by alterations in synaptic plasticity at glutamate synapses in the reward pathway, involving the ventral tegmental area, nucleus accumbens, and frontal cortex [8,11]. In addition to the relevance of the reward circuitry in the development of addiction, other brain areas such as the hippocampus (HP) have been implicated [12]. This brain structure plays a great role in processing the associations between the environmental context and unconditioned stimuli such as drugs of abuse [13]. Within the HP, the long-term potentiation (LTP) characterized by an enduring increase in the efficacy of glutamatergic synaptic transmission is a major form of synaptic plasticity. This phenomenon is accepted as a molecular mechanism for learning and memory in the brain in which contextual cues are relevant [14,15]. We have previously described

[HTTPS://WWW.HEIGHUBS.ORG](https://www.HEIGHUBS.ORG)

How to cite this article: Artur de la Villarmois E, Constantin MF, Bregonzio C, Pérez MF. Diazepam Withdrawal Expression is related to Hippocampal NOS-1 Upregulation. Arch Pharm Pharma Sci. 2018; 2: 001-009.

001

Colaboraciones:

Además, durante el periodo de tesis doctoral, la autora participó en los siguientes trabajos científicos:

Artur de la Villarmois E, Gabach LA, Bianconi S2, Poretti MB2, Occhieppo V, Schiöth HB, Carlini VP2, Pérez MF. “Pharmacological NOS-1 Inhibition Within the Hippocampus Prevented Expression of Cocaine Sensitization: Correlation with Reduced Synaptic Transmission”. *Mol Neurobiology*. 2019 Aug 3. DOI: 10.1007/s12035-019-01725-3.

M. Jazmín Silvero C, Diamela M. Rocca, **Emilce Artur de la Villarmois**, KelseyFournier, Anabel E. Lanterna, Mariela F. Pérez, M. Cecilia Becerra, and Juan C. Scaiano. “Selective Photoinduced Antibacterial Activity of Amoxicillin-Coated Gold Nanoparticles: From One-Step Synthesis to in Vivo Cytocompatibility”. *ACS Omega*, 2018, 3 (1), pp 1220–1230. DOI: 10.1021/acsomega.7b01779

Natalia Andrea Marchese*, **Emilce Artur de la Villarmois***, Martín O. Basmadjian, Mariela Fernanda Perez, Gustavo Baiardi, Claudia Bregonzio “Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations”. *Psychopharmacology (Berl)*, 2016 Mar; 233(5):795-807. DOI: 10.1007/s00213-015-4153-1.*Equal contribution.

Molecular Neurobiology
<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01725-3>



Pharmacological NOS-1 Inhibition Within the Hippocampus Prevented Expression of Cocaine Sensitization: Correlation with Reduced Synaptic Transmission

Emilce Artur de la Villarmois¹ · Laura A. Gabach¹ · Santiago Bianconi^{2,3} · Maria Belen Poretti^{2,3} · Victoria Occhieppo¹ · Helgi B. Schiöth² · Valeria P. Carlini^{2,3} · Mariela Fernanda Pérez¹

Received: 7 May 2019 / Accepted: 29 July 2019
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Behavioral sensitization to psychostimulants hyperlocomotor effect is a useful model of addiction and craving. Particularly, cocaine sensitization in rats enhanced synaptic plasticity within the hippocampus, an important brain region for the associative learning processes underlying drug addiction. Nitric oxide (NO) is a neurotransmitter involved in both, hippocampal synaptic plasticity and cocaine sensitization. It has been previously demonstrated a key role of NOS-1/NO/sGC/cGMP signaling pathway in the development of cocaine sensitization and in the associated enhancement of hippocampal synaptic plasticity. The aim of the present investigation was to determine whether NOS-1 inhibition after development of cocaine sensitization was able to reverse it, and to characterize the involvement of the hippocampus in this phenomenon. Male Wistar rats were administered only with cocaine (15 mg/kg/day i.p.) for 5 days. Then, animals received 7-nitroindazole (NOS-1 inhibitor) either systemically for the next 5 days or a single intra-hippocampal administration. Development of sensitization and its expression after withdrawal were tested, as well as threshold for long-term potentiation in hippocampus, NOS-1, and CREB protein levels and gene expression. The results showed that NOS-1 protein levels and gene expression were increased only in sensitized animals as well as CREB gene expression. NOS-1 inhibition after sensitization reversed behavioral expression and the highest level of hippocampal synaptic plasticity. In conclusion, NO signaling within the hippocampus is critical for the development and expression of cocaine sensitization. Therefore, NOS-1 inhibition or NO signaling pathways interferences during short-term withdrawal after repeated cocaine administration may represent plausible pharmacological targets to prevent or reduce susceptibility to relapse.

Keywords Cocaine · CREB gene expression · Hippocampus · Long-term potentiation · Nitric oxide synthase · Sensitization

Introduction

Substance abuse is a chronic disease that represents a serious public health problem [1]. Many factors may influence the

development and maintenance of addiction, including access to drugs, social environment, genetic predisposition, and psychiatric comorbidities [2]. While extensive investigations about the neural mechanisms of addiction have been performed continuously, it is still unclear why users remain vulnerable to relapse following extended periods of abstinence [3]. Furthermore, despite the considerable effort devoted to treat addiction [4–6], there are not effective treatment options available to treat drug dependence and relapse.

Repeated administration of psychostimulants such as cocaine in rats causes progressive increases in locomotor activity, called behavioral sensitization, that are correlated to differential neuroadaptations in a proportion of animals exposed to the drug, independently of the administration protocol used [7, 8]. Because sensitization can be context dependent, long lasting, and can increase subsequent drug self-administration [9], it is a useful animal model of relapse [10].

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01725-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mariela Fernanda Pérez
 mfperez@fcq.unc.edu.ar

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Farmacología, IFEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre y Medina Allende, 5000, Córdoba, Argentina

² Functional Pharmacology, Department of Neuroscience, Uppsala University, Uppsala, Sweden

³ INICSA-CONICET, Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Córdoba, Argentina

Published online: 03 August 2019

Springer

This is an open access article published under an ACS AuthorChoice License, which permits copying and redistribution of the article or any adaptations for non-commercial purposes.



Cite This: ACS Omega 2018, 3, 1220–1230

Article

Selective Photoinduced Antibacterial Activity of Amoxicillin-Coated Gold Nanoparticles: From One-Step Synthesis to in Vivo Cytocompatibility

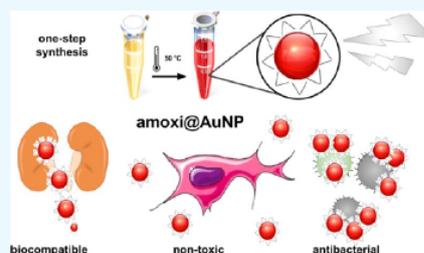
M. Jazmín Silvero C.,^{†,‡} Diamela M. Rocca,[‡] Emilce Artur de la Villarmois,[§] Kelsey Fournier,[†] Anabel E. Lanterna,[†] Mariela F. Pérez,[§] M. Cecilia Becerra,^{*,‡} and Juan C. Scaiano^{*,†,§}

[†]Department of Chemistry and Biomolecular Sciences and Centre for Advanced Materials Research (CAMaR), University of Ottawa, 10 Marie Curie, Ottawa, Ontario K1N 6N5, Canada

[‡]Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Departamento de Ciencias Farmacéuticas and [§]Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET), Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Haya de la Torre S/N, Córdoba X5000, Argentina

Supporting Information

ABSTRACT: Photoinduced antibacterial gold nanoparticles were developed as an alternative for the treatment of antibiotic-resistant bacteria. Thanks to the amoxicillin coating, they possess high in vivo stability, selectivity for the bacteria wall, a good renal clearance, and are completely nontoxic for eukaryotic cells at the bactericidal concentrations. A simple one-step synthesis of amoxi@AuNP is described at mild temperatures using the antibiotic as both reducing and stabilizing agent. Time-resolved fluorescence microscopy proved these novel nano-photosensitizers, with improved selectivity, are bactericidal but showing excellent biocompatibility toward eukaryotic cells at the same dose (1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) when co-cultures are analyzed. Their stability in biological media, hemocompatibility, and photo-antibacterial effect against sensitive and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* were evaluated in vitro, whereas toxicity, renal clearance, and biodistribution were studied in vivo in male Wistar rats. The use of these nanoparticles to treat antibiotic-resistant infections is promising given their high stability and cytocompatibility.



INTRODUCTION

Antibiotic-resistant (AR) bacteria and the lethal infections they can cause are a subject of public concern.^{1,2} Indeed, the World Health Organization has described antibiotic resistance as “a problem so serious that it threatens the achievements of modern medicine”.³ Thus, there is an urgent need for the development of novel strategies and drugs. In recent years, nanoparticles have been tested as potential antibacterial agents; particularly, gold nanoparticles (AuNPs) were chosen to act as photosensitizers because of their inert nature and effectiveness in spite of their polymorphism and polydispersity.⁴ Further, AuNP plasmons can absorb visible light,⁵ thus avoiding the use of highly energetic wavelengths that cause cell photodamage, proving useful for cancer treatment.⁶ Additionally, we have shown the photoinduced bactericidal properties of AuNPs utilizing green light, even on AR clinical strains.^{7–10} Thus, plasmon excitation of the AuNPs can produce highly reactive oxygen species (ROS) levels causing oxidative stress after 4 h of photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), leading to bacterial death. Furthermore, in vitro studies suggest that these AuNPs are nontoxic for eukaryotic cells. These results

stimulated the present work to explore the selectivity toward prokaryotic cells in cell co-cultures and the biocompatibility and distribution of the particles in vivo.

Many in vivo studies on the biodistribution and toxic effects of AuNPs show that they are controlled by the nanomaterial size, shape, and coating.^{11–13} The limited pore size of the endothelial wall in the tissue is the primary delivery barrier for nanoparticles, but it also allows selective accumulation in certain tissues. When nanoparticles are administered through intraperitoneal (IP) or intravenous injection, a variety of serum proteins bind to their surface, which are recognized, internalized, and carried to the liver or spleen.¹⁴ It is known that the majority of the AuNPs after IP injection are distributed to the liver and spleen in 2–3 h¹⁵ and that AuNPs had a high blood-clearance rate being mostly distributed in the liver, followed by the spleen and lungs.¹⁶ No matter the pathway used, AuNPs seemed to migrate into the circulatory system first

Received: November 12, 2017

Accepted: January 17, 2018

Published: January 30, 2018



Brain Angiotensin II AT₁ receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations

Natalia Andrea Marchese¹ · Emilce Artur de la Villarmois¹ ·
Osvaldo Martin Basmadjian¹ · Mariela Fernanda Perez¹ · Gustavo Baiardi² ·
Claudia Bregonzio¹

Received: 6 April 2015 / Accepted: 13 November 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Rationale Angiotensin II, by activation of its brain AT₁-receptors, plays an active role as neuromodulator in dopaminergic transmission. These receptors participate in the development of amphetamine-induced behavioral and dopamine release sensitization. Dopamine is involved in cognitive processes and provides connectivity between brain areas related to these processes. Amphetamine by its mimetic activity over dopamine neurotransmission elicits differential responses after acute administration or after re-exposure following long-term withdrawal periods in different cognitive processes.

Objective The purpose of this study is to evaluate the AT₁-receptor involvement in the acute and long-term amphetamine-induced alterations in long-term memory and in cellular-related events.

Methods Male Wistar rats (250–300 g) were used in this study. Acute effects: Amphetamine (0.5/2.5 mg/kg i.p.) was administered after post-training in the inhibitory avoidance (IA) response. The AT₁-receptor blocker Losartan was administered i.c.v. before a single dose of amphetamine (0.5 mg/kg i.p.).

Long-term effects: The AT₁-receptors blocker Candesartan (3 mg/kg p.o.) was administered for 5 days followed by 5 consecutive days of amphetamine (2.5 mg/kg/day, i.p.). The neuroadaptive changes were evidenced after 1 week of withdrawal by an amphetamine challenge (0.5 mg/kg i.p.). The IA response, the neuronal activation pattern, and the hippocampal synaptic transmission were evaluated.

Results The impairing effect in the IA response of post-training acute amphetamine was partially prevented by Losartan. The long-term changes induced by repeated amphetamine (resistance to acute amphetamine interference in the IA response, neurochemical altered response, and increased hippocampal synaptic transmission) were prevented by AT₁-receptors blockade.

Conclusions AT₁-receptors are involved in the acute alterations and in the neuroadaptations induced by repeated amphetamine associated with neurocognitive processes.

Keywords Angiotensin II · Amphetamine · AT₁ receptors · Long-term memory · Long-term potentiation · Hippocampus · Inhibitory avoidance · FOS · Losartan · Candesartan

Natalia Andrea Marchese and Emilce Artur de la Villarmois contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00213-015-4153-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mariela Fernanda Perez
mfperetz@fcq.unc.edu.ar

¹ Instituto de Farmacología Experimental Córdoba (IFEC-CONICET)
Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

² Laboratorio de Neurofarmacología, (IIBYT-CONICET),
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

Introduction

The role of brain renin-angiotensin system (RAS) is complex, and its main active peptide, angiotensin II (Ang II), was initially described as a modulator of autonomic and hormonal systems, sensorial and cognitive processes, and it also participates in the regulation of cerebral blood flow. Ang II exerts its known actions principally by activation of the angiotensin receptors type 1 (AT₁-R) (Saavedra 1992; Saavedra et al. 2005). Locally produced brain Ang II plays an important role in the modulation of central dopaminergic neurotransmission. Dopamine (DA) innervated areas such as caudate putamen