



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Correlatos neurales del seguimiento de reglas complejas
bajo el efecto del diazepam en hombres y mujeres

Dra. Zeidy Muñoz Torres



Ciencia Nueva
DOCTORADOS UNAM

Dra. María Corsi Cabrera
Asesor

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se desarrolló con el apoyo de CONACYT, proyecto: 50709.

Los estudios de doctorado fueron apoyados con la beca: 199466 otorgada por CONACYT.

Esta tesis fue apoyada con la beca de doctorado otorgada por DGAPA, proyecto PAPIIT:
IN217311-2.

Los estudios de Resonancia Magnética funcional se llevaron a cabo en la Unidad de Aceleración Nuclear y Resonancia Magnética S.A. de C.V. del Hospital Ángeles del Pedregal

Parte de los análisis de datos y del trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Sueño, de la Facultad de Psicología de la UNAM.

Los análisis séricos fueron realizados en el Laboratorio y Banco de Sangre del Hospital Ángeles del Pedregal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con la participación de personas muy valiosas a quienes a continuación quiero expresar mi agradecimiento:

A la *Dra. Mary Corsi*, por tu dirección ininterrumpida en esta investigación y por constituir un pilar fundamental en mi formación en el ámbito neurocientífico. El conocimiento que me brindaste me acompañará por siempre, gracias por darme la oportunidad de aprender a tu lado.

A los miembros de mi comité tutorial quienes estuvieron presentes durante el proceso de este proyecto:

Dra. Thalía Harmony, por sus ideas y conocimiento vertidos en el mejoramiento de esta investigación.

Dr. Alonso Fernández Guasti, por sus aportaciones y observaciones puntuales para enriquecer este proyecto.

A los integrantes del jurado de examen:

Dr. José Luis Díaz, Dr. Juan Fernández Ruíz, Dra. Robyn Hudson, Dra. Josefina Ricardo por sus observaciones precisas y su trabajo destinado a enriquecer esta tesis doctoral y por su compromiso con la ciencia.

Al *Dr. Jorge Armony*, por tu asesoría constante en el campo de la RMf y tu contribución en el desarrollo de este proyecto.

A *David Trejo* por tu apoyo en los registros de RMf y por resolver problemas técnicos y no técnicos presentados en el camino.

Al *Dr. Rubén Conde* por apoyar en la adquisición de imágenes de RM.

A la *Dra. Ale Ruiz*, por todo tu apoyo académico y personal, por estar en los momentos más significativos y por tu valiosa amistad.

Al *Dr. Juan Valadez* quien me contagió su pasión por la neuroanatomía funcional y me encaminó al mundo de las neurociencias.

A *Leo Hernández* por tu apoyo incondicional en todo momento y amistad.

A *los participantes* en esta investigación por su tiempo invertido y motivación por contribuir a la ciencia.

A *Everardo Castro* por tu paciencia y comprensión, por caminar a mi lado en esta recta final.

A mis amigos con quienes comparto una gran pasión por las neurociencias: *Corinne, Jana, Ale, Paty, Ollga, Guadalupe, Bety, Edy, Marmen, Gabiux, Andreus, Luis, Diana y Laura* por su gran tenacidad, trabajo y compromiso que siempre son alentadores.

Al Laboratorio de Sueño por permitirme coincidir con compañeros productivos y admirables: *Yola del Río, Luuz Galindo, Bere Gálvez, Vero Martínez, Enrique Flores, Mundo González, Alfonso Pérez, Jorge Sánchez, Ale Rosales, P Figueredo, Itzel Galán, Jaqui Álvarez, Sara Herreño, Beerelim Corona, Fátima Espinoza, Olga Rojas.*

A *Lourdes Lara Ayala* del Instituto de Neurobiología por su eficiente desempeño y profesionalismo en la coordinación de las videoconferencias en cada evaluación.

A *Angélica Téllez Garmendia*, responsable de apoyos del doctorado por su total disposición y eficacia al brindar atención a los estudiantes.

Dedico este trabajo a:

Susy Torres Monjaraz

Jony Muñoz Torres

Beto MS Muñoz Torres

Sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de esta etapa.

Toño, Julieta y Rosy Nehme Cantú y a

Diego y Melina Ramírez Torres

Persistan siempre en lograr lo que se propongan.

RESUMEN

La vida cotidiana nos confronta con la necesidad de seleccionar respuestas rápidas entre opciones apropiadas al contexto, basadas en reglas complejas. El diazepam (DZ) es un fármaco importante en la práctica clínica que reduce el estado de alerta y puede interferir con los procesos cognoscitivos que subyacen a la implementación de reglas complejas. Existe evidencia experimental de las diferencias cerebrales anatómicas y funcionales entre hombres y mujeres que llevan a plantear un efecto sexualmente dimórfico del DZ asociado al seguimiento de reglas complejas.

Se estudiaron los efectos del DZ, en comparación con placebo (PL), en la ejecución y la respuesta cerebral (BOLD), utilizando Resonancia Magnética funcional, durante la implementación de reglas complejas en hombres y mujeres.

En 18 sujetos saludables (9 mujeres) se midió la actividad BOLD durante la ejecución de una tarea de seguimiento de reglas complejas con DZ y PL administrados de manera contrabalanceada en dos sesiones diferentes.

Una dosis de 10 mg de DZ fue suficiente para incrementar los tiempos de reacción y reducir la precisión en la tarea de seguimiento de reglas pero no en una tarea de control motor que contenía el mismo tipo de estímulos. Las mujeres cometieron más errores en la ejecución de la tarea que los hombres bajo DZ. En todos los participantes, la implementación de reglas complejas con PL activó regiones frontales incluyendo el giro del cíngulo. Bajo DZ un mayor número de áreas fueron reclutadas durante la tarea en comparación con PL, especialmente la región parieto-occipital y el giro temporal medial. Las mujeres en comparación con los hombres con PL mostraron un decremento en las regiones activas durante la tarea. Con DZ, se observó una reducción de actividad en regiones prefrontales en las mujeres, mientras que los hombres reclutaron un mayor número de áreas en la región posterior del cerebro.

Estos hallazgos indican que el DZ podría alterar la actividad neural necesaria para la implementación de reglas complejas, apoyando la noción que la influencia del DZ en la conducta va más allá de los aspectos motores y compromete las funciones cognoscitivas complejas. El efecto negativo del DZ más acentuado en las mujeres que en los hombres advierte la importancia de generar tratamientos farmacológicos basados en las diferencias sexuales.

ABSTRACT

Every day life confronts us with the need to select rapid responses between contextually appropriate choices, based on the combination of sensory cues and complex rules. Diazepam (DZ), a clinically important drug, reduces alertness and can interfere with the cognitive processes underlying the implementation of complex rules. Experimental data have shown anatomic and functional brain differences between men and women that lead us to expect sexual dimorphic effects of the DZ associated to behavioural guided by complex rules.

We studied DZ effects, compared to placebo (PL), on performance and brain responses (BOLD), using functional Magnetic Resonance Imaging, during rule implementation, in men and women.

BOLD activity was measured in 18 healthy subjects (9 women) during a rule-guided task with DZ and PL administered in two different counterbalanced sessions.

A 10 mg dose of DZ was sufficient to increase reaction times and to reduce accuracy in a rule-guided task but not in a motor task containing the same stimuli type. Women committed more errors in the task performance than men under DZ. In all participants with PL, implementing arbitrary rules activated frontal regions including the cingulate gyrus. Under DZ more brain areas were recruited during the task compared to PL, especially parieto-occipital regions, and medial temporal lobe. Women in comparison to men with PL showed a decrease in active regions during the task. With DZ, a reduction in activity was observed in prefrontal regions in women, while men recruited more areas in the posterior region of the brain.

These findings indicate that DZ might disrupt the neural activity necessary to implement complex rules, supporting the notion that DZ influence on behaviour goes beyond motor aspects that can potentially compromise complex cognitive functions. The negative effect of DZ more evident in women than in men denote the importance to develop pharmacological treatments based on sex differences.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Seguimiento de Reglas Complejas	4
2.1.1 Aprendizaje de la regla	4
2.1.2 Almacenamiento a largo plazo	6
2.1.3 Recuperación de la regla	6
2.1.4 Mantenimiento de la información	6
2.1.5 Implementación de la regla	7
2.2 Inhibición de Respuestas	8
2.3 Benzodiazepinas y Sistema GABAérgico	10
2.3.1 Sistema GABAérgico	11
2.3.2 Subunidades del receptor GABA _A	12
2.3.3 Distribución del receptor GABA _A	13
2.4 Efectos Cognoscitivos de las Benzodiazepinas	14
2.5 Resonancia Magnética	15
2.5.1 Principios físicos	15
2.5.2 Resonancia magnética funcional	19
2.6 Cambios Cerebrales Relacionados con las Benzodiazepinas	20
2.6.1 Electrofisiológicos	20
2.6.2 Metabólicos	22
2.7 Diferencias entre Hombres y Mujeres	24
2.7.1 Efectos organizadores de los esteroides sexuales	25
2.7.2 Efectos activadores de los esteroides sexuales	29
2.7.3 Esteroides sexuales en el cerebro	32
2.7.4 Influencias hormonales versus genéticas	35
2.7.5 Efecto de las benzodiazepinas en la función cerebral	36
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
3.1 Objetivos	39
3.2 Hipótesis	40
4. MÉTODO	41
4.1 Sujetos	41
4.2 Procedimiento	41
4.3 Tarea Cognoscitiva	42
4.4 Tarea Motora	44
4.5 Adquisición de las Imágenes de RM	45

4.6 Análisis de los Datos	45
4.6.1 Datos conductuales	45
4.6.2 Datos de RMf	47
5. RESULTADOS	49
5.1 Niveles Séricos	49
5.2 Resultados Conductuales	49
5.2.1 Tiempos de reacción	49
5.2.2 Aciertos	53
5.3 Resultados de Resonancia Magnética funcional	56
5.3.1 Tarea de seguimiento de reglas bajo placebo	56
5.3.2 Efectos del diazepam	58
5.3.3 Diferencias sexuales	61
6. DISCUSIÓN	69
6.1 Ejecución	69
6.2 Correlatos Neurales	69
6.3 Diferencias Sexuales	72
6.4 Limitaciones	74
6.5 Experimentos Futuros	74
7. CONCLUSIÓN	76
8. BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXO 1	95
ANEXO 2	97
ANEXO 3	114

1. INTRODUCCIÓN

Las teorías modernas del procesamiento de la información explican las funciones cognoscitivas en términos del acoplamiento de una gran población de neuronas que se unen dinámicamente en su actividad (Gray 1999; Singer 1999; von der Malsburg 1999; Wolfe & Cave 1999). Diferentes trabajos experimentales señalan que la actividad coherente de múltiples áreas corticales distribuidas desempeña un papel crucial en las funciones cognoscitivas (Silberstein et al. 2004; Tononi & Edelman 1998) y en el nivel de consciencia (Corsi-Cabrera et al. 2006; Imas et al. 2006). Se sugiere que poblaciones neuronales específicas desempeñan operaciones elementales, mientras que las funciones complejas requieren de la integración de diferentes operaciones en toda la corteza cerebral (Tononi & Edelman 1998; Nunez 2000; Fingelkurts 2001). Este complejo dinamismo de interconexiones neuronales obliga a que el sistema tenga un patrón muy preciso tanto temporal como espacial en las respuestas celulares inhibitoras y excitadoras. Si se rompe el balance entre excitación e inhibición las redes neuronales se modifican y cambian su actividad, lo cual puede verse reflejado en la conducta. Existen diferentes técnicas que nos dan información de la actividad cerebral.

Una de las técnicas que ha permitido estudiar la función del cerebro en humanos es la Resonancia Magnética funcional (RMf). Esta técnica de neuroimagen no es invasiva, lo que permite acceder a la actividad neural de personas saludables y no hay restricciones en cuanto al número de estudios que se pueden llevar a cabo en una misma persona, permitiendo un diseño de investigación en el que el mismo sujeto sea su propio control. A través de la RMf se mide la respuesta asociada al nivel de oxígeno en la sangre (BOLD: *Blood Oxygen Level Dependent*); debido a que las células requieren de oxígeno para su funcionamiento, los cambios en el nivel de oxígeno indican la región o regiones cerebrales que incrementaron o disminuyeron su actividad. Diversos fármacos utilizados actualmente, como las benzodiazepinas, ejercen un efecto directo en la actividad neural.

Las benzodiazepinas (BZDs) son un grupo de fármacos ampliamente utilizado en la práctica clínica (Alldredge et al. 2001) y de manera no prescrita (McCabe 2005; Paredes et al. 2008). El diazepam (DZ) es un fármaco de la familia de las BZDs que facilita la acción del GABA (ácido gamma-aminobutírico), aumentando la inhibición neuronal. El DZ produce un efecto ansiolítico, aunque también tiene efectos como hipnótico y sedante reduciendo el nivel de

vigilia, lo que puede llevar a efectos colaterales como lentitud de los movimientos y disminución de la coordinación psicomotora (Lucchesi et al. 2003; Greenblatt et al. 2005). También se han reportado efectos no deseados en diversas funciones cognoscitivas como en la memoria (Mintzer & Griffiths 1999; Pompéia et al. 2004; Pompéia et al. 2008), la atención (Carter et al. 1998; Mintzer & Griffiths 1999; Snyder et al. 2005; Muñoz-Torres et al. 2011), y tareas complejas (Pompéia et al. 2007) aunque no queda claro si este deterioro cognoscitivo se debe a un efecto sobre las estructuras involucradas en el nivel de alerta o en redes neuronales que comandan funciones cognoscitivas complejas.

La vida cotidiana demanda seguir reglas arbitrarias diferentes para cada escenario o según el contexto. Muchas veces la conducta que se emite va en contra a lo ya aprendido y se requiere frenar una respuesta automatizada. Existen situaciones que plantean un conflicto y se debe inhibir una respuesta habitual. Por ejemplo, si vamos manejando un automóvil y perdemos el control la respuesta automática es frenar, pero si estamos en un terreno con nieve esa respuesta no es la adecuada, se necesita acelerar para volver a tener el control del automóvil. Se debe responder de manera contraintuitiva. En ocasiones el escenario demanda que una conducta automática se suspenda o incluso se revierta.

Uno de los principales objetivos de la presente investigación es conocer cómo se afecta la implementación de reglas complejas que demandan una respuesta contraintuitiva así como explorar los correlatos neurales asociados a esta actividad cognoscitiva con placebo (PL) y bajo los efectos del DZ mediante la técnica de RMf.

La mayoría de las investigaciones se enfocan en estudiar sólo hombres y en especies inferiores, machos; asumiendo que ocurre lo mismo en el cerebro femenino. Aunque existe mayor cantidad de información concerniente a lo que ocurre en el cerebro masculino que en el cerebro femenino, cada vez más se han desarrollado investigaciones dirigidas a estudiar las diferencias entre hombres y mujeres en todos los niveles: genético, molecular, celular, sistémico y conductual, y en áreas como la cognición, las emociones y la organización funcional cerebral (para una revisión ver Corsi-Cabrera et al. 2007). Se sabe que el efecto de las hormonas sexuales no se limita a la conducta sexual sino que tiene implicaciones en diferentes condiciones como la actividad locomotora (Copeland et al. 2004; Lightroot 2008), diferentes tareas cognoscitivas (Solis-Ortiz et al. 2004; Solis-Ortiz & Corsi-Cabrera 2008), la respuesta a condiciones

estresantes (Fernandez-Guasti et al. 1999; Kajantie & Phillips 2005) y la prevalencia de desórdenes psiquiátricos (Naninck et al. 2011). Esto lleva a plantear un segundo objetivo: comparar el efecto del DZ entre hombres y mujeres tanto en la actividad neural como en la ejecución durante una tarea guiada por reglas complejas.

La investigación científica ha demostrado que las diferencias sexuales tienen un impacto en el desarrollo del sistema nervioso y en el riesgo de presentar enfermedades neurodegenerativas, en desórdenes psiquiátricos y afectivos, en enfermedades neurológicas y en la respuesta a diversas drogas. Conocer las diferencias sexuales permite desarrollar tratamientos específicos que reduzcan los efectos colaterales dependiendo de los diferentes mecanismos de acción que se activan en hombres y mujeres y ofrece información esencial desde un punto de vista teórico que permitirá un conocimiento más profundo para el entendimiento del cerebro y la conducta humana.

2. ANTECEDENTES

2.1 Seguimiento de Reglas Complejas

La vida diaria nos confronta con la necesidad de seguir reglas complejas y seleccionar la respuesta apropiada entre respuestas competitivas inmersas en un ambiente cambiante. Las reglas son constructos que podemos aprender de manera explícita como las señales de tránsito o implícitas como las aprendidas en la interacción social. Las reglas pueden estar basadas en asociaciones sencillas de estímulo-respuesta o en esquemas abstractos de mayor complejidad.

Las reglas complejas las podemos definir como el conjunto de instrucciones que van a guiar la conducta a una meta y que contienen diferentes planes de acción que deben ser ajustados a un contexto cambiante, en contraste con las reglas simples, que sólo dejan un plan de acción sin tomar en cuenta el contexto para seleccionar la respuesta apropiada.

Para seguir una regla son necesarios diferentes procesos cognoscitivos como el aprendizaje de la regla, el almacenamiento a largo plazo, la recuperación, el mantenimiento de la información necesaria y finalmente, su implementación. A continuación, se exponen diferentes estudios neuropsicológicos en pacientes con lesión cerebral, estudios de neuroimagen con sujetos sin alteración cerebral y estudios electrofisiológicos realizados en monos en los que se han visto implicadas diferentes redes cerebrales en los distintos procesos cognoscitivos del seguimiento de reglas. En la Fig. 2.1 se puede ver un esquema que resume los principales sitios corticales asociados con cada uno de los procesos que subyacen al seguimiento de reglas.

2.1.1 Aprendizaje de la regla

Los primeros estudios dirigidos a estudiar la función de la región lateral de la corteza prefrontal fueron desarrollados en monos y relacionaron esta región con dos aspectos centrales de la memoria de trabajo: el almacenamiento por un corto tiempo y la manipulación de la información (Jacobsen 1936). Experimentos posteriores mostraron que las neuronas de la corteza prefrontal lateral incrementan su tasa de disparos durante el periodo de espera en diferentes tareas de memoria de trabajo (Fuster & Alexander 1973; Kojima & Goldman-Rakic 1984). Las propiedades de disparo de estas neuronas mostraron ser selectivas para memorizar claves específicas de los estímulos (Constantinidis et al. 2001). Estos patrones de disparo se

interpretaron como la “representación neuronal” de las claves, ya que la actividad neuronal parece representar la clave, puesto que se encuentra activa aunque la clave ya no esté presente en el ambiente. Para el aprendizaje del procedimiento de una regla se ha visto implicado principalmente el neocórtex que comprende el caudado y putamen (Thorn et al. 2010). La región medial del lóbulo temporal se ha relacionado con la memoria declarativa de la adquisición de las reglas (Poldrack et al. 2001).

También la corteza prefrontal lateral se ha implicado en el aprendizaje de reglas tanto en humanos (Toni et al. 2001) como en primates no humanos (Murray et al. 2000). Específicamente, las lesiones de la corteza prefrontal ventro-lateral en monos muestran un deterioro del aprendizaje en tareas asociativas visuomotoras, que requieren que los sujetos usen una de varias reglas arbitrarias de asociación entre los estímulos visuales y la respuesta. Estas lesiones deterioran tanto la habilidad de usar reglas arbitrarias aprendidas antes de la lesión como la habilidad de aprender nuevas asociaciones (Bussey et al. 2001). El papel de la corteza prefrontal ventro-lateral en el aprendizaje de asociaciones estímulo-respuesta y estímulo-estímulo, en parte está mediado por sus conexiones con la corteza temporal inferior. También se ha encontrado que monos con lesiones en la corteza prefrontal ventro-lateral presentan un déficit en el aprendizaje de reglas de igualdad a la muestra (Toni et al. 2001). Lo que sugiere que la corteza prefrontal ventro-lateral no sólo participa en asociaciones simples sino que también en el aprendizaje de reglas complejas.

Distintos estudios de neuroimagen muestran que las tareas que demandan usar reglas abstractas activan el polo frontal, la región más anterior del lóbulo frontal (área de Brodmann 10, en el Anexo 1 se muestran las áreas de Brodmann (BA)). Christoff y colaboradores (2000; 2009) observaron un patrón de activación prefrontal relacionado con el nivel de abstracción de las reglas a seguir. Las regiones posteriores de la corteza prefrontal se activaron con información concreta, la información con un nivel moderado de abstracción reclutó regiones más anteriores, y la información con un alto nivel de abstracción se asoció con la activación del polo frontal. Encontraron este mismo patrón independientemente de la dificultad de la tarea e incluso cuando los participantes no fueron capaces de llegar a una solución.

2.1.2 Almacenamiento a largo plazo

El lóbulo temporal ha sido implicado en el almacenamiento a largo plazo de asociaciones semánticas y no semánticas (Bussey et al. 2001). Los datos arrojados en un estudio de neuroimagen en humanos en el que se les instruyó con una clave verbal o no verbal mantener una regla específica por un periodo, para luego responder dependiendo de una regla *compuesta* conformada por un grupo de contingencias (i.e. “presiona el botón izquierdo si las condiciones son semejantes y el botón derecho si no son semejantes”) o una regla *simple* que contenía un solo plan de acción (i.e. “presiona el botón izquierdo al final de ensayo”), sugieren que la región posterior del lóbulo temporal interviene en el significado de las reglas mientras que el trabajo en conjunto de las cortezas prefrontal ventro-lateral y temporal asociado en la recuperación del significado de la regla (Bunge et al. 2003). Apoyando estos hallazgos, se encuentra que utilizando símbolos de tránsito conocidos y otros arbitrarios, el lóbulo temporal posterior izquierdo está fuertemente modulado por el conocimiento del significado de las reglas (Donohue et al. 2005). En contraste, la corteza prefrontal ventro-lateral izquierda se ha encontrado relacionada con la complejidad de la regla durante la presentación de la clave para seguir una regla específica (Bunge et al. 2003).

2.1.3 Recuperación de la regla

En las tareas cognoscitivas, al final del ensayo los sujetos tienen que tomar decisiones dependiendo de las reglas en relación a un estímulo o a un conjunto de estímulos. Para desplegar la respuesta correcta tendrían que recuperar la regla a seguir. La corteza prefrontal ventro-lateral ha sido consistentemente involucrada en la recuperación de la regla. Como en el estudio de Bunge y colaboradores (2003), mencionado anteriormente, en el que los sujetos deben mantener la regla por un periodo mientras esperan dar la respuesta, o en estudios en los que examinan la relación de los cambios metabólicos asociados con el aprendizaje de la regla (Toni et al. 2001) comparando la recuperación de reglas bien aprendidas con otras reglas aprendidas insuficientemente (Donohue et al. 2005).

2.1.4 Mantenimiento de la información

La corteza prefrontal también se ha relacionado con el mantenimiento de las reglas a lo largo de la tarea. Sin embargo, la localización específica de la región implicada ha sido diferente

entre varios estudios de neuroimagen. Entre los factores que influyen en las discrepancias entre estudios es el tipo de regla que tiene que ser mantenida, también si la regla es mantenida activamente en la memoria de trabajo o si se renueva en cada ensayo cuando aparece el estímulo “blanco” (Johnson et al. 2003).

2.1.5 Implementación de la regla

Finalmente, para seleccionar y emitir la respuesta más adecuada de acuerdo a reglas arbitrarias y en dirección a una meta se ha visto que la corteza prefrontal ventral juega un papel central en la selección de las acciones en conjunto con el giro del cíngulo anterior y las cortezas motoras suplementaria, premotora y motora primaria las cuales participan en la emisión de las respuestas.

Hoshi (2008) examina los mecanismos neuronales de la interacción entre la representación de una regla con el sistema motor y encuentra una organización jerárquica con el lóbulo prefrontal para el control motor, al comparar la actividad neuronal de las cortezas motora primaria, premotora y prefrontal lateral. Las neuronas de la corteza prefrontal lateral codifican las reglas de la tarea, en tanto que las neuronas de las cortezas premotora y motora primaria, están involucradas en la planeación y la ejecución del movimiento, respectivamente.

La mayoría de las tareas empleadas presentan estímulos visuales por lo que se espera la participación de la corteza occipital para codificar las características de los elementos. Un gran número de evidencias apuntan a distinguir dos vías neuronales principales en la corteza visual: la vía ventral y la vía dorsal (Mishkin & Ungerleider 1982). La vía ventral proyecta de la corteza visual a la corteza temporal inferior e interviene en la identificación de los objetos. En contraste, la vía dorsal proyecta de la corteza visual a la corteza parietal y participa en la localización de los objetos. La corteza temporal inferior tiene conexiones con la corteza prefrontal, en especial con la región ventro-lateral (Petrides & Pandya 1984). En cambio, la corteza parietal proyecta tanto a las cortezas premotora y motora primaria como a la corteza prefrontal dorsolateral (Petrides & Pandya 1984). Los datos anatómicos muestran que la corteza prefrontal dorsolateral envía proyecciones directamente al lóbulo parietal y a las áreas motoras (premotora y motora suplementaria) (Petrides & Pandya 1999); cerrando el ciclo de percepción de estímulos,

seguimiento de una regla o conjunto de reglas; y acción, desplegando la respuesta motora previamente decidida.

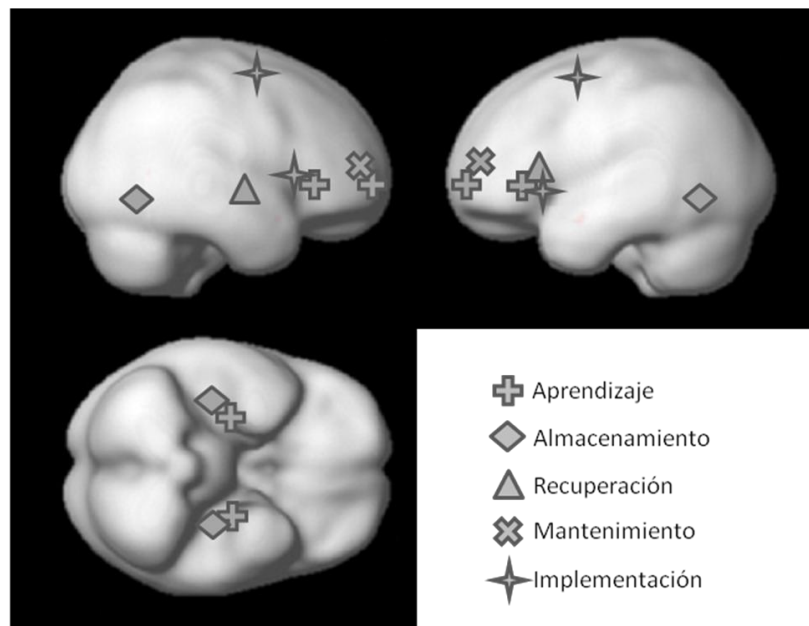


Fig. 2.1 Principales sitios corticales relacionados con los diferentes pasos del seguimiento de reglas en diferentes experimentos (ver la sección 2.1 del texto), esquematizados en una vista lateral de los hemisferios derecho e izquierdo y una vista basal del cerebro.

2.2 Inhibición de Respuestas

Las reglas a seguir pueden requerir la inhibición de respuestas motoras orientadas a algún objetivo específico. Resulta central en el control de la planeación y ejecución de una conducta orientada por una meta, la habilidad para seleccionar acciones apropiadas que sean ventajosas conductualmente así como la supresión de acciones que sean inapropiadas en un contexto específico, o innecesarias porque interfieren con otra meta cognoscitiva y/o motora o porque se trata de respuestas impulsivas o automáticas. En otras palabras, la inhibición de una respuesta es un proceso cognoscitivo y motor para cancelar una acción planeada o suprimir acciones inapropiadas o respuestas impulsivas.

Los pacientes con lesión en la corteza frontal han mostrado un deterioro en la inhibición de sus respuestas. Específicamente, la región medial del giro superior (Picton et al. 2007; Simmonds et al. 2008) y el giro frontal inferior derecho (Aron et al. 2003; Aron & Poldrack

2006; Chambers et al. 2007) se han visto consistentemente involucrados en la inhibición de respuestas. Así como una red que abarca regiones de los lóbulos temporal y parietal (Rubia et al. 2001; Aron & Poldrack 2006; Cai & Leung 2009).

Uno de los paradigmas principales para medir la inhibición de respuestas es *Go/No-go*, el cual demanda responder a un estímulo presentado frecuentemente y no responder a los estímulos poco frecuentes, generalmente la relación es de 3:1 entre los estímulos frecuentes e infrecuentes y se han utilizado estímulos visuales y auditivos. La tarea se centra en el estímulo *Go*, generando una inercia a responder e incrementando el esfuerzo necesario para inhibir la respuesta en los estímulos *No-go*.

En diversos estudios se ha visto que pacientes con lesiones en los lóbulos frontales presentan más errores en los estímulos *No-go* en comparación con pacientes que tienen lesiones en otra región cortical (Drewe 1975a; 1975b; Déary & Richer 1995; Picton et al., 2007). Al analizar más a detalle el tipo de errores y la región frontal específica de la lesión Picton y colaboradores (2007) encuentran que los pacientes con lesiones en la región medial superior de los lóbulos frontales, en particular en la porción superior del área 6 de Brodmann, incluyendo áreas motoras suplementaria y premotora del hemisferio izquierdo tuvieron un incremento en el número de falsos positivos; mientras que los pacientes con lesión de la región anterior del giro del cíngulo (BA 24 y 32) o en la corteza prefrontal ventro-lateral (BA 44, 45 y 47) del hemisferio derecho respondieron más lentamente y con mayor variabilidad en sus tiempos de reacción.

En investigaciones utilizando RMf donde evalúan la diferencia en activación entre una tarea *Go/No-go* y otra tarea *Go* muy simple encontraron un incremento bilateral del giro del cíngulo y diferentes regiones del prefrontal (Casey et al. 1997); aunque no ha habido consistencia en cuanto a si la activación es mayor en el hemisferio derecho (Kawashima et al. 1996) o el izquierdo (Rubia et al. 2001). Los estudios con fMRI también indican que la inhibición de respuestas está asociada con la activación difundida en regiones prefrontales. Buchsbaum y colaboradores (2005) elaboraron un meta-análisis con 18 estudios *Go/No-go*. Encontraron grupos de activaciones (*clusters*) en 14 regiones cerebrales diferentes. Los *clusters* más grandes correspondían a regiones frontales como los giros frontales medio e inferior (BA 44 y 46), el giro frontal medial (BA 6), y el giro del cíngulo derecho (BA 39 y 40). En otro meta-análisis, llevado a cabo de sus propios estudios, Garavan y colaboradores (2006) encontraron un

incremento de actividad en la corteza prefrontal dorsolateral derecha (BA 9, 10, 44 y 46) y en el giro del cíngulo anterior derecho (BA 32) durante la ejecución del paradigma *Go/No-go*, aunque también se vieron involucradas áreas de la corteza prefrontal izquierda (BA 6, 9 y 46).

Otro paradigma utilizado, para medir la inhibición de respuestas, es la tarea de señal de alto (*stop-signal task*) que requiere responder al estímulo frecuente y suprimir la respuesta ocasionalmente, cuando el estímulo “blanco” es precedido por la señal de alto. Se ha reportado un serio deterioro en la ejecución de esta tarea en pacientes que presentan lesiones en el giro frontal inferior derecho (Aron et al. 2003). Incluso, la ejecución de esta tarea disminuyó temporalmente en sujetos sanos a quienes se les aplicó estimulación magnética transcraneal, método utilizado para inhibir las neuronas del giro frontal inferior derecho, mientras que la estimulación de la corteza contralateral no ejerció el mismo efecto conductual (Chambers et al. 2007). Sin embargo, Li y colaboradores (2006) encontraron relacionada la eficiencia en la inhibición de respuestas con activación del giro frontal superior (BA 8) y el giro precentral (BA 9) izquierdos.

2.3 Benzodiacepinas y Sistema GABAérgico

Las benzodiacepinas (BZDs) son un grupo de fármacos ampliamente utilizado en la práctica clínica (Alldredge et al. 2001) y de manera no prescrita (McCabe 2005; Paredes et al. 2008), tienen efectos ansiolíticos, aunque también presentan efectos como hipnóticos, relajantes musculares, anticonvulsivos y se utilizan de manera complementaria con anestésicos generales (Rang et al. 2001). Para que un fármaco actúe es necesario que llegue al sitio de acción atravesando distintas barreras orgánicas como la barrera hematoencefálica. Las BZDs son fármacos con una alta liposolubilidad por lo que llegan fácilmente al cerebro. Se absorben completamente por vía oral y alcanzan su concentración máxima en sangre de 1 a 4 horas, con variaciones que dependen de: la BZD administrada, la vía de administración y las características individuales. En la Tabla 2.1 se muestran las características farmacocinéticas de algunas BZDs.

Tabla 2.1 Características farmacocinéticas de algunas benzodiazepinas.

Ejemplos de BZDs	Tmax oral (h)	T½ (h)	Unión a proteínas (%)	Liposolubilidad
DE ACCIÓN CORTA/RÁPIDA				
Midazolam	0.3	1.3-3.2	96	1.54
Triazolam	1.2	2.2	77	0.64
DE ACCIÓN INTERMEDIA				
Bromazepam	1	10-20	70	0.24
Flunitrazepam	1	15-30	78	0.31
Lorazepam	1.2	9-22	85	0.48
DE ACCIÓN LARGA				
Clorazepato	0.9	24-60	82	
Clordiazepóxido	1-4	6-28	94-97	
Flurazepam	1	40-100	96	
Diazepam	1	20-100	96-98	1.0

Tmax oral = concentración máxima en sangre por vía oral, T½ = vida media del fármaco, h = reportado en horas (Modificado de Moro & Lizasoain 2003).

El mecanismo de acción de las BZDs se lleva a cabo en el sistema del ácido gamma-aminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro de los mamíferos (Sivilotti & Nistri 1991). Las BZDs ejercen su acción en el receptor GABA_A, al unirse a él, producen un cambio en la conformación de las subunidades permitiendo que los iones de cloro (Cl⁻) extracelular fluyan al interior de la neurona, alejándola del umbral de disparo. En bajas concentraciones las BZDs incrementan la frecuencia de apertura del canal de Cl⁻ (Martin et al. 1993). Se estima que aproximadamente el 40% de las sinapsis en el sistema nervioso central (SNC) son GABAérgicas (Christensen & Fonnum 1992).

2.3.1 Sistema GABAérgico

El GABA es sintetizado a partir del glutamato por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), es liberado a la hendidura sináptica y su acción acaba al ser recapturado

por el transportador (GAT) localizado en la presinapsis o en la célula glial, donde es metabolizado a glutamato y posteriormente a glutamina para liberarse y entrar a la neurona e iniciar de nuevo la síntesis de GABA. Se han descrito 3 clases diferentes de receptores a GABA, los receptores GABA_A, GABA_B y GABA_C.

Los receptores GABA_A son proteínas transmembrales que conforman un canal iónico por el que fluye el Cl⁻; los receptores GABA_B están acoplados a la proteína G con lo que se activan cascadas de segundos mensajeros en el interior de la célula. Los receptores GABA_C también son ionóforos de Cl⁻, pero a diferencia del receptor GABA_A son insensibles a las benzodiazepinas, los barbitúricos y el baclofeno. El sistema GABAérgico es de gran importancia ya que juega un papel central en la regulación de la excitabilidad del cerebro, y muchas sustancias importantes como las BZDs, los barbitúricos, el etanol, algunos neuroesteroides, anticonvulsivantes y anestésicos generales interactúan con los receptores a GABA para ejercer su efecto farmacológico. Existen datos de modelos sinápticos que sugieren que el receptor GABA_A trabaja en el SNC como modulador y sincronizador de redes neurales (Jedlicka & Backus 2006).

2.3.2 Subunidades del receptor GABA_A

El receptor GABA_A es un ensamble pentamérico derivado de la combinación de diferentes subunidades, el cual se expresa en el SNC y el SN periférico. Entre las unidades identificadas en el cerebro de mamíferos están: α_1 - α_6 , β_1 - β_3 , γ_1 - γ_3 , δ , ϵ , π y ρ_1 - ρ_3 (Olsen & Tobin 1990; Burt & Kamatchi 1991; Davies et al. 1997). Aunque se ha investigado la distribución de las principales subunidades en diferentes regiones cerebrales (Wisden et al. 1992) resulta complicado esclarecer los ensamblajes presentes en el cerebro ya que desde el punto de vista teórico se podrían formar numerosos tipos de combinaciones.

Existen reportes que indican que las subunidades α_1 , $\beta_{2/3}$ y γ_2 coexisten en diferentes receptores (Pritchett & Seeburg 1991; Benke et al. 1994) y que la combinación de subunidades más abundante incluye dos α , dos γ y una β (Backus et al. 1993) o dos α , dos β y una γ (Chang et al. 1998). Existen estudios dirigidos a localizar el sitio de unión de diversas sustancias en los receptores GABA_A. El sitio de las BZDs está localizado en la entre las subunidades α y γ (Zezula et al. 1996). Así, el receptor que contiene dos isoformas de la subunidad α y dos γ contiene dos sitios en los que se unen las BZDs (Khan et al. 1996). Los diferentes tipos de

receptores GABA_A con los que interaccionan las BZDs se han asociado con diferentes aspectos farmacológicos producidos por estos fármacos. Por ejemplo, el subtipo con subunidades α_1 está asociado con sedación (McKernan et al. 2000) mientras que los subtipos α_2 y α_3 median los efectos ansiolíticos (Dias et al. 2005).

2.3.3 Distribución del Receptor GABA_A

En animales se ha estudiado tanto la distribución como la afinidad que tienen diferentes drogas con los receptores GABA_A utilizando autoradiografía y animales *knockout*, (ver Korpi et al. 2002). En humanos es posible visualizar y cuantificar los receptores a BZDs *in vivo* con dos técnicas de medicina nuclear: SPECT (*single-photon emission computed tomography*) y PET (*positron emission tomography*). Con SPECT se puede detectar la recaptura y el enriquecimiento regional de radiotrazadores marcados con isótopos que emiten protones de baja energía y el PET permite cuantificar dinámicamente la distribución cerebral por regiones de radio-fármacos marcados con isótopos que emiten positrones (Ollinger & Fessler 1997).

El flumazenil fue el primer antagonista potente al sitio de las BZDs marcado para utilizarlo con PET (Hantraye et al. 1984; Maziere et al. 1984). Poco después, se marcó el iomazenil para usarlo en el SPECT (Beer et al. 1990). Ambos compuestos presentan tasas de unión altamente específicas lo que representa la distribución de los receptores a BZDs en el cerebro. Gründer y colaboradores (2001) encuentran la expresión de estos receptores en orden decreciente en la corteza occipital, la corteza temporal, el cerebelo, el tálamo y el puente. En otro estudio se encontró que el sitio con mayor unión del flumazenil fue la corteza occipital medial seguida de la corteza frontal, el cerebelo, el tálamo, el estriado y el puente (Persson et al. 1985). También se ha reportado la presencia de los receptores a BZDs en el giro del cíngulo, en el estriado, el hipocampo y en la corteza insular (Abadie et al. 1992; Abi-Dargham et al. 1994; 1995; Abadie et al. 1996; Maeda et al. 2003; Salmi et al. 2008). Como se puede ver, la amplia distribución de receptores a BZD no sólo en estructuras relacionadas con sus efectos terapéuticos sino en circuitos importantes para los procesos cognoscitivos sugiere un detrimento en la actividad cerebral que pudiera verse reflejado en la ejecución de tareas cognoscitivas cuando se administran compuestos agonistas al GABA como el diazepam.

2.4 Efectos Cognoscitivos de las Benzodiazepinas

Al reducir el nivel de alerta las BZDs pueden generar efectos no deseados como somnolencia y afectar la ejecución en una gran variedad de tareas, que van desde aquellas que tienen una carga cognoscitiva pequeña, como oprimir un botón repetidamente lo más rápido posible (*finger tapping*) (Curran et al. 1998; Mintzer et al. 2001) y movimientos oculares (Masson et al. 2000) hasta otras que involucran cargas cognoscitivas mayores. Por ejemplo, las tareas atencionales que se han reportado que se afectan con las BZDs incluyen: atención selectiva (Preston et al. 1988; Mintzer & Griffiths 1999; Coull et al. 2004; Boucart et al. 2007), mecanismos de orientación atencional (Carter et al. 1998), atención sostenida y dividida (Preston et al. 1988; Snyder et al. 2005; Hindmarch et al. 2005) y la ejecución de tareas que demandan funciones psicomotoras como cancelación de dígitos o letras y sustitución de símbolos psicomotora (Lucchesi et al. 2003; Greenblatt et al. 2005), ejecución en simulaciones de manejo automovilístico (Leufkens et al. 2007) y el aprendizaje motor de una tarea de escritura con teclado (Cunha et al. 2006).

El efecto adverso de las BZDs en la memoria ha sido ampliamente documentado con diversas tareas presentadas en computadora y de lápiz y papel. Se ha encontrado un decremento, relacionado a la dosis de DZ administrada, en el recuerdo libre de estímulos presentados al principio, mientras que los estímulos presentados al final se vieron menos afectados (Ghoneim & Mewaldt 1990) lo cual sugiere una mayor resistencia en los mecanismos que intervienen en la memoria a corto plazo (ver también Frith et al. 1984; Hennessey et al. 1991; Robbins et al. 1997). De igual manera, la memoria semántica se ha encontrado conservada en diferentes estudios (Curran 1991; Fluck et al. 1998). Entre otros aspectos deteriorados con dosis clínicas de BZDs están: la memoria de reconocimiento (Green et al. 1996; Mintzer & Griffiths 1999), la memoria prospectiva (Rich et al. 2006), la memoria de trabajo (Coull 1999; Pompéia et al. 2007) y la memoria episódica con tareas de recuerdo de palabras (Ghoneim & Mewaldt 1990), de historias (Gorissen & Eling 1998) y de imágenes (Legrand et al. 1995). En menor medida se han explorado procesos cognoscitivos más complejos. Coull y colaboradores (1999) encontraron un deterioro al ordenar alfabéticamente arreglos de letras que no es secundario a los efectos del DZ en la memoria episódica; también se encontró un deterioro en la planeación de movimientos en la tarea Torre de Londres con DZ (Deakin et al. 2004) y un enlentecimiento en el razonamiento

deductivo de premisas sin afectar la precisión en las respuestas (Pompéia et al. 2007; Rusted et al. 1991).

2.5 Resonancia Magnética

Existen técnicas basadas en imágenes que mapean la actividad cerebral en el tiempo y en el espacio como la tomografía por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés), la tomografía por emisión de un solo positrón (SPECT) y la resonancia magnética funcional (RMf). Estas tres técnicas ofrecen un mapa cerebral relacionado con medidas metabólicas asociadas con la oxigenación o con el consumo de glucosa de las células neurales. A continuación se describen los principios generales de la RMf por ser la técnica empleada en la presente investigación.

El propósito resonancia magnética funcional RMf es realizar una localización de las redes anatómicas que participan en un proceso funcional. Sin embargo, no es la actividad neuronal *per se* lo que se mide con RMf, sino más bien las demandas metabólicas suplidas por el flujo sanguíneo. Antes de describir el proceso metabólico medido con RMf se expondrán de manera general los principios básicos de la formación de imágenes en resonancia magnética (RM).

2.5.1 Principios físicos

La RM es un fenómeno que se relaciona con campos magnéticos y ondas electromagnéticas de radiofrecuencia (RF). La información obtenida en RM proviene de las propiedades magnéticas de los átomos. La base física de este fenómeno está dada por la existencia de dos tipos de movimientos de los núcleos atómicos: el movimiento giratorio o *spín* (alrededor de su eje) y el movimiento de precesión (alrededor del eje gravitacional) (ver Fig. 2.2).

Dichos movimientos generan un campo magnético alrededor de cada núcleo, especialmente de los átomos que poseen un número impar de protones y neutrones. En éstos predominan las cargas positivas y en consecuencia, adquieren mayor actividad magnética. El campo magnético generado se representa como un vector que posee magnitud y dirección y está constituido por el total de protones y neutrones.

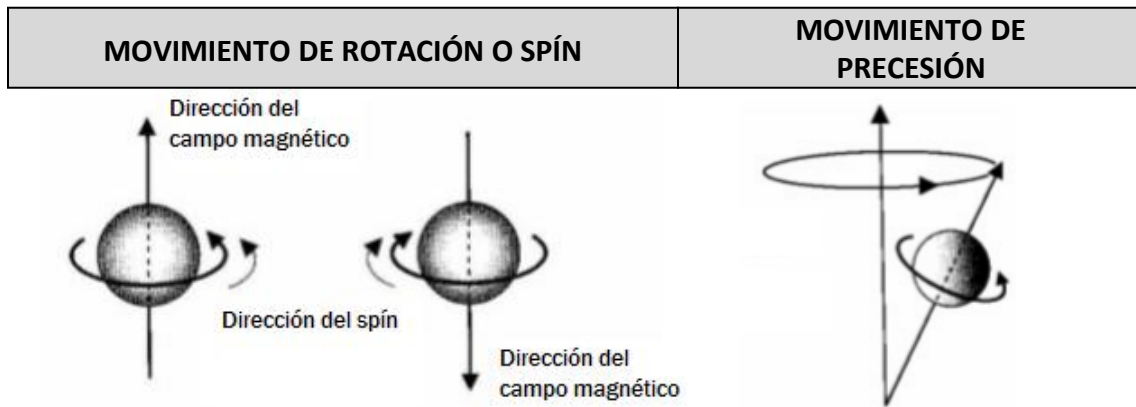


Fig. 2.2 Esquema de los tipos de movimiento de los núcleos atómicos, derecha movimiento de rotación, izquierda movimiento de precesión.

Dado que el hidrógeno es el átomo más abundante en los tejidos orgánicos y su núcleo sólo tiene un protón contribuye de manera importante a la señal de RM. En ausencia de un campo magnético intenso, los *spins* de los protones de hidrógeno están orientados al azar y tienden a cancelarse entre sí, la suma de todos los momentos magnéticos de los *spins* en diferentes orientaciones generalmente llamada magnetización neta, es muy pequeña en condiciones normales (Fig. 2.3a). Sin embargo, al introducir un campo magnético (B_0) de alta intensidad los núcleos de hidrógeno se alinean en paralelo o antiparalelo con el campo magnético incrementando así el vector de magnetización neta (Fig. 2.3b).

La señal de resonancia magnética es el resultado de la excitación individual de protones magnetizados por irradiación con energía de radiofrecuencia a frecuencias específicas, LA absorción de esta energía causa un desplazamiento de los momentos magnéticos fuera de su equilibrio, dando como resultado un sistema excitado que tiende a regresar a su punto inicial y al hacerlo emite energía proporcional al número de protones excitados y es el componente de la señal detectada de resonancia magnética.

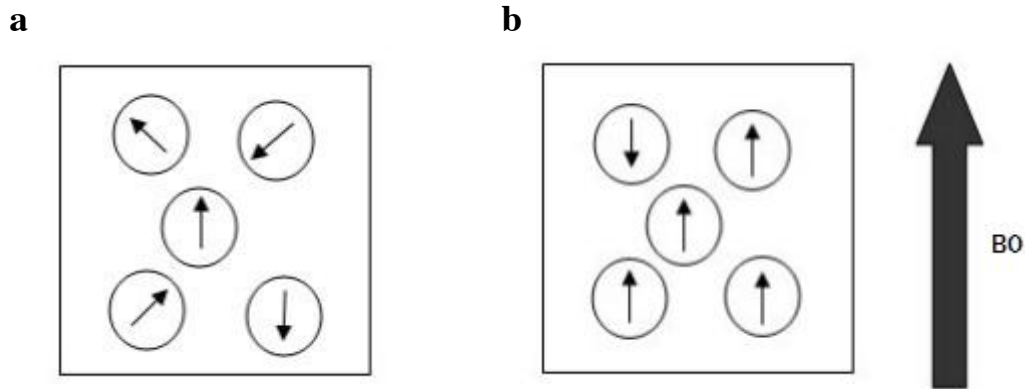


Fig. 2.3 Esquema de los protones de hidrógeno. Las flechas pequeñas marcan la dirección de los momentos magnéticos. **a)** los protones con *spins* orientados al azar **b)** campo magnético (B_0) aplicado que alinea los protones en paralelo o antiparalelo.

La resonancia ocurre cuando la energía de un pulso de radiofrecuencia es la precisa para generar una transición entre las direcciones de protones en paralelo y antiparalelo. En el caso de los protones magnetizados los *spins* orientados en forma paralela, al campo magnético aplicado externamente, tiene baja energía mientras que los que los orientados de manera antiparalela tienen alta energía. El sistema puede absorber energía cuando los *spins* de baja energía cambian a alta energía y solamente cuando la energía exacta es aplicada toma lugar la transición. La frecuencia específica de los pulsos de RF debe corresponder a la precesión de los *spins*. La amplitud y duración del pulso de RF determinan el número de núcleos que cambian de dirección.

2.5.1.1 Relajación Longitudinal

La señal de RM creada después de un pulso de excitación decae a través del tiempo, generalmente en segundos. Este fenómeno fue llamado relajación del *spin*. Tiene dos mecanismos primarios: la relajación longitudinal (T_1) es la constante de tiempo que mide la conversión de *spins* en dirección antiparalela a paralela.

2.5.1.2 Relajación Transversa

Por otro lado, está la relajación transversa (T_2) la cual representa la interacción entre *spins* que causa la pérdida de la coherencia de fase cuando están en el plano transversal por un pulso de excitación además puede influir otros factores como la movilidad del líquido local. T_2 ocurre después de un pulso de excitación de 90° que envía la magnetización al plano transversal.

En un campo magnético perfecto con una muestra ideal todos los núcleos experimentarían la misma intensidad del campo magnético y exhibirían la fuerza, la coherencia y la rotación en la frecuencia de Larmor o la frecuencia de giro hasta que ocurriera el proceso de T1. En una muestra real se observa un decaimiento.

*2.5.1.3 Relajación T2**

El tiempo de relajación T2 estrella (T2*) es el más importante para la RMf. En presencia de un campo magnético extrínseco no homogéneo el decaimiento de T2 es más rápido, este proceso se le conoce como T2*. La pérdida de la magnetización transversa ocurre en decenas de ms, mientras que la muestra excitada regresa en segundos al equilibrio.

El decaimiento de T2* es distinto que el de T2 ya que este último es resultado de las fluctuaciones aleatorias de las frecuencias de Larmor a nivel molecular, mientras que el primero es producto de una variación en la aplicación del campo magnético estático. Hay distintas posibilidades para generar variaciones en el campo, la primera es que el campo magnético no sea totalmente homogéneo, esta tiene un mínimo efecto. Por otro lado, la geometría y composición de la muestra tienen una repercusión mayor en las inhomogeneidades.

En la cabeza humana, por ejemplo, hay regiones que tienen grandes variaciones en la susceptibilidad magnética. Eso significa que si un campo magnético estático perfecto es aplicado a la cabeza, los átomos que la componen no responderán de la misma manera. Esto es notorio en el borde entre los distintos componentes como es el aire y los tejidos, también en los vasos sanguíneos donde los niveles de desoxihemoglobina producen una diferencia en el campo magnético a lo largo del tejido lo que conduce a un decaimiento rápido de T2*, esto constituye la base del contraste BOLD.

Cada tejido, según su abundancia de protones y el tiempo que tarda en relajarse luego de ser estimulado, emite una señal de mayor o menor intensidad que es captada por los receptores del equipo. Esta señal se cuantifica en valores numéricos y finalmente se transforma en una escala de tonos de gris que es la imagen anatómica que vemos.

2.5.2 Resonancia magnética funcional

En 1936 Linus Pauling y Charles Coryell realizaron investigaciones sistemáticas sobre la estructura de la hemoglobina. Ellos descubrieron que la molécula de hemoglobina tiene propiedades magnéticas que varían dependiendo si la molécula está unida o no al oxígeno.

La hemoglobina oxigenada es diamagnética, presentando entonces una débil repulsión ante un campo magnético. La hemoglobina sin oxígeno, por otro lado, es paramagnética, y es atraída a un campo magnético. La hemoglobina desoxigenada tiene un 20% de mayor susceptibilidad magnética. Esto significa que presenta una mayor magnetización cuando es colocada en un campo magnético.

Se requieren de fuertes campos magnéticos para poder apreciar el contraste basado en la concentración de oxígeno en el flujo sanguíneo cerebral, y se deben utilizar secuencias de RM sensibles a T2*. La sangre altamente oxigenada muestra mayor señal, y la desoxigenada menor señal de RM.

A principios de 1990 Ogawa y colaboradores investigaron el flujo sanguíneo cerebral manipulando las concentraciones de O₂ y CO₂ en roedores con potentes campos magnéticos de más de 7 teslas. En condiciones de aire y más aún en anoxia, se observaron finas líneas perpendiculares a la superficie cerebral cortical de los roedores. Este grupo de investigadores postuló que dichas líneas eran resultado de un aumento en la susceptibilidad magnética dada por la hemoglobina desoxigenada, que es paramagnética, dentro de los vasos sanguíneos corticales. Esta interpretación fue corroborada por el mismo grupo al estudiar tubos de ensayo con sangre oxigenada y desoxigenada. Se demostró una disminución de la señal T2* en los tubos con sangre desoxigenada en comparación a la señal generada por la sangre oxigenada.

Este efecto fue llamado contraste dependiente del nivel de oxígeno en la sangre (**BOLD** *Blood Oxygen Level Dependent*), que puede medir cambios funcionales de la actividad del cerebro.

El contraste BOLD ocurre no porque la hemoglobina oxigenada aumenta, sino porque la hemoglobina desoxigenada suprime la intensidad de la señal de RM, y al ser desplazada por el

flujo de sangre con mayor concentración de hemoglobina oxigenada, permite la obtención de una mayor señal de RM.

La señal BOLD es asociada a eventos únicos. La mayor amplitud se registra de 4 a 6 segundos luego del evento, y esto es parte de las limitaciones de especificidad temporal de la RMf. La señal disminuye de nuevo cuando el flujo disminuye pero el volumen permanece aumentado, fenómeno conocido como “*under shoot*”, resultado del nuevo aumento de la concentración de hemoglobina desoxigenada.

La técnica RMf nos ofrece imágenes de la actividad cerebral asociada a los cambios metabólicos. Específicamente, la variante BOLD se sustenta en los cambios de oxigenación en la hemoglobina. Debido a que las células requieren de oxígeno para su funcionamiento, los cambios en el nivel de consumo de oxígeno indican la región o regiones cerebrales que incrementaron o disminuyeron su actividad, resultando una medida indirecta de la actividad neuronal.

Existen estudios en monos (Logothetis et al. 2001) y en humanos (Huettel 2004) en los que comparan medidas electrofisiológicas y metabólicas de RMf, estos estudios reportan que la actividad de campo local predice mejor los cambios vistos en la actividad BOLD en comparación con la actividad multiunitaria y la actividad de una sola neurona.

Las imágenes cerebrales obtenidas mediante RMf tienen dos ventajas principales: se obtienen de manera no invasiva y proveen una vista dinámica de ciertos cambios metabólicos en estructuras corticales y subcorticales.

2.6 Cambios Cerebrales Relacionados con las Benzodiazepinas

2.6.1 Electrofisiológicos

El análisis cuantitativo de la actividad electroencefalográfica (EEG) ha demostrado ser un método efectivo para determinar los efectos de drogas psicotrópicas, como las BZDs. Entre las medidas utilizadas para el análisis de la actividad eléctrica cerebral se encuentran las que están en el dominio de la frecuencia. Éstas se derivan del espectro de frecuencias del EEG, el cual se puede obtener transformado la señal de voltaje (μV), desplegada en el tiempo (seg) en potencia (μV^2), en función de la frecuencia (Hz). De estas medidas las más exploradas con EEG

cuantitativo son la potencia absoluta y el acoplamiento temporal, las cuales están relacionadas entre sí.

La potencia absoluta es un índice de la cantidad de energía que existe en una banda de frecuencia determinada, mientras que el acoplamiento temporal es un índice del grado en que dos áreas cerebrales diferentes muestran cambios correlacionados en diferentes bandas de frecuencia. Por lo que refleja el grado de asociación funcional entre áreas cerebrales.

Diversos estudios han identificado un patrón eléctrico asociado a las BZDs. En estado de reposo se ha observado un incremento de la actividad beta y un decremento de alfa y theta (Ansseau et al. 1984; Greenblatt et al. 1989; 2005; Mandena et al. 1992; Urata et al. 1996; Bauer et al. 1997; Romano-Torres et al. 2002; Lucchesi et al. 2003).

Sin embargo, este patrón EEG no siempre se ha encontrado. Fingelkurts y colaboradores (2004) registrando simultáneamente EEG y magnetoencefalografía (MEG), no encuentran que aumente la potencia de las frecuencias rápidas con la administración de lorazepam. Llevan a cabo un análisis espectral con bandas más estrechas que las convencionales, y reportan un mayor número de segmentos con una gran mezcla de actividad de subpoblaciones neuronales que tienen su propio modo de disparo, actividad que han llamado polirítmica. Los autores sugieren que el aumento en beta encontrado en otras investigaciones podría ser el resultado de promediar los segmentos EEG con gran actividad polirítmica.

Cuando hay una demanda cognoscitiva tampoco se observó este patrón EEG. En un estudio previo (Muñoz-Torres et al. 2011, ver anexo 2) que llevamos a cabo para explorar los cambios eléctricos cerebrales durante una tarea de atención sostenida, bajo el efecto de una dosis de 5 mg de DZ en comparación con placebo y en comparación con la línea base, se encontró una disminución de la potencia de todas las bandas registradas: delta, theta, alfa y beta. Lo cual podría indicar que la ejecución de una tarea de atención sostenida neutraliza el incremento de la actividad rápida observado en reposo sin afectar el típico decremento observado en las bandas delta, theta y alfa.

Se ha observado un efecto negativo de las BZDs en los componentes electrofisiológicos relacionados a eventos indicando una reducción de la atención y del análisis de las características de los estímulos (van Leewen et al. 1995; Bauer et al. 1997; Unrug et al. 1997; Jääskeläinen et

al. 1999; Lucchesi et al. 2003). Diferentes trabajos experimentales señalan que el acoplamiento temporal de múltiples áreas corticales distribuidas desempeña un papel crucial en las funciones cognoscitivas (Corsi-Cabrera et al. 1993; Detsche et al. 1998; Silberstein et al. 2004; Tononi & Edelman 1998) y en el nivel de consciencia (Corsi-Cabrera et al. 2006; Imas et al. 2006). Pocos estudios han cuantificado la similitud funcional de dos sitios cerebrales bajo el efecto de las BZDs. En reposo se ha reportado un aumento en el acoplamiento temporal de delta y theta entre regiones frontales y un decremento de theta entre regiones parieto-occipitales y de alfa entre regiones fronto-centrales del hemisferio derecho, adicionalmente a un incremento en el acoplamiento temporal de beta entre regiones homólogas de los hemisferios cerebrales tras la administración de DZ (Romano-Torres et al. 2002).

El aumento en el acoplamiento temporal se ha visto confirmado con otras BZDs y métodos de análisis (Fingelkurts et al. 2004; Sampaio 2007). Durante la ejecución de una tarea de atención sostenida se observó un incremento del acoplamiento temporal en el hemisferio derecho en la banda alfa la segunda vez que ejecutaron la tarea de atención en comparación a la primera vez con placebo. Aunque la dosis administrada de DZ (5 mg) no redujo el acoplamiento temporal de alfa en el hemisferio derecho, sí impidió el incremento observado en la condición placebo, que podría estar relacionado con el proceso atencional con el que se ha involucrado el hemisferio derecho (Posner & Raichel 1997) y con el incremento del acoplamiento temporal visto durante el procesamiento cognoscitivo (Corsi-Cabrera et al. 1993; Detsche et al. 1998; Tononi & Edelman 1998; Silberstein et al. 2004).

Durante una tarea de integración sensoriomotora se encontró un mayor acoplamiento temporal entre regiones centrales del hemisferio derecho y la línea media con una dosis moderada de bromazepam (3 mg) en comparación con placebo y con el doble de la dosis (Minc et al. 2010).

2.6.2 Metabólicos

La RMf y el PET se han utilizado para conocer el efecto de las BZDs en la actividad metabólica cerebral. Matthew y colaboradores (1995) utilizando PET observaron una reducción dosis dependiente del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en voluntarios normales a quienes se les administró intravenosamente lorazepam. El nivel de FSC regresó al nivel basal al administrar el

antagonista de BZDs flumazenil. El grupo de Volkow reporta una disminución del FSC en las cortezas occipital, frontal, parietal y temporal, en cerebelo, ganglios basales y en el tálamo (Volkow et al. 1995; Wang et al. 1999). Al normalizar los valores del metabolismo regional con todo el cerebro, el tálamo y la corteza occipital fueron las regiones más sensibles y estos cambios metabólicos se correlacionaron positivamente con la evaluación subjetiva de cansancio y la sensación de sueño. En contraste, la corteza temporal bilateral mostró un incremento de actividad al normalizar los datos (Volkow et al. 1995). La administración de una dosis de DZ impidió que la señal BOLD, registrada en RMf, incrementara como ocurrió tanto con un estimulante como con el placebo (Kleinschmidt et al. 1999).

A dosis mayores de DZ, pero no sedantes, se ha reportado una disminución de la actividad metabólica global del cerebro (de Witt et al. 1991) predominando en el lóbulo frontal (Mathew et al. 1985). Otras BZDs como el alprazolam y el midazolam redujeron el FSC global (Roy-Byrne et al. 1993; Veselis et al. 1997; Streeter et al. 1998), con una disminución del FSC regional, dosis dependiente, en el giro del cíngulo, la ínsula, la corteza prefrontal, el tálamo y las cortezas de asociación parietal y temporal. Adicionalmente, se observó un incremento del FSC relativo en áreas occipitales (Veselis et al. 1997). También se ha encontrado una disminución del FSC de manera dosis dependiente en corteza la prefrontal dorsolateral izquierda, la corteza orbito-frontal bilateral, el giro temporal medio y el hipocampo derecho. Estas regiones se han involucrado con el procesamiento semántico, la memoria de trabajo y con la codificación de información verbal y de memoria; por lo que los autores sugieren que este efecto podría relacionarse con el deterioro observado en tareas cognitivas presentadas posteriormente (Reinsel et al. 2000).

Las investigaciones anteriores se llevaron a cabo en estado de reposo. El efecto de las BZDs durante la ejecución de tareas ha sido escasamente explorado. El grupo de Coull (1999) investigó el efecto funcional del DZ mediante PET en una tarea de memoria y en otra de planeación. Encuentra que el DZ decreció la actividad bilateralmente en las cortezas prefrontal y temporal, específicamente, la corteza dorsal prefrontal izquierda se atenuó durante la codificación de la información en la tarea de memoria, mientras que la región opercular prefrontal se atenuó durante la planeación. Sin embargo, este mismo grupo utilizando RMf, encuentra un aumento de la activación durante una tarea de detección de estímulos visuales en

presencia de ruido blanco, en el núcleo mediodorsal talámico, el putamen y el mesencéfalo, bajo los efectos del midazolam. En un estudio enfocado a medir el efecto del DZ en medidas clínicamente relevantes con RMf no encuentran cambios significativos en la actividad BOLD tras la administración de 5 mg de DZ en comparación con PL durante tres tareas diferentes: motora, generación de palabras y de memoria de trabajo (Ragnehed et al. 2007). Algunos estudios recientes se han enfocado en medir la actividad cerebral asociada al procesamiento emocional bajo el efecto de alguna BZD.

En general, por efecto de las BZDs, se ha reportado una disminución de la actividad en la amígdala (Paulus, et al. 2005; Anderson et al. 2007; Del-Ben et al. 2010), y en la ínsula (Paulus, et al. 2005) aunque hay estudios que reporta un incremento de actividad en estas estructuras dependiendo del estímulo emocional (Arce et al. 2007). Se ha reportado una disminución BOLD en la corteza orbitofrontal derecha, aunada a un incremento de activación en la región anterior del giro del cíngulo (Del-Ben et al. 2010).

2.7 Diferencias entre Hombres y Mujeres

A partir de trabajos como el de Levine (1966) en el que describe las diferencias en la conducta sexual en ratas machos y hembras señalando la influencia de las hormonas sexuales y la participación exclusiva del hipotálamo, la investigación de las diferencias sexuales en el cerebro estuvieron centradas en la conducta y las hormonas sexuales y el hipotálamo. En los últimos años se han venido desarrollado investigaciones dirigidas a estudiar las diferencias sexuales en todos los niveles: genético, molecular, celular, sistémico y conductual en áreas como memoria, emoción, procesamiento de rostros, percepción del dolor, navegación, actividad locomotora, visión, escucha, niveles de neurotransmisión, acción hormonal y desórdenes mentales, así como diferencias en la organización de la funcional cerebral.

La conducta emerge gradualmente a medida que el cerebro se desarrolla. Al principio el desarrollo cerebral está bajo el control de programas genéticos. Las influencias del ambiente empiezan a ejercer su efecto *in útero* volviéndose centrales luego del nacimiento. Existen datos neurofisiológicos y clínicos que llevan a plantear un efecto diferencial del DZ entre hombres y mujeres.

2.7.1 Efectos organizadores de los esteroides sexuales

La hipótesis de los efectos organizadores señala que los andrógenos de las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso alteran permanentemente el desarrollo del cerebro causando un funcionamiento masculino en la edad adulta. Es decir, la diferenciación del sistema nervioso y consecuentemente del comportamiento, está guiada por las mismas señales esteroideas que rigen la diferenciación sexual del cuerpo. Estos efectos organizadores de los esteroides, alteran de manera permanente el desarrollo del sistema nervioso, en contraste con los efectos activadores de los esteroides, que influyen transitoriamente en el cerebro adulto.

Los esteroides de los testículos ejercen una influencia masculinizante en el cuerpo durante el primer trimestre del embarazo. Después de ese periodo los andrógenos se vuelven menos efectivos, en el adulto los esteroides ejercen un efecto modesto sobre las estructuras con receptores a andrógenos. Se propone que el sistema nervioso también es sensible al efecto masculinizante de los andrógenos por un breve tiempo conocido como periodo crítico.

Se ha visto que la administración de estrógeno a ratas machos adultos castrados no feminiza todas las funciones del SNC, así como los andrógenos en hembras adultas ovariectomizadas no masculinizan totalmente la función del SNC debido a que hay cambios permanentes, originados de una organización cerebral específica para cada sexo durante el desarrollo. El concepto tradicional de la diferenciación sexual del cerebro señala que una vez que se forman los testículos en el feto por medio del gen Sry (región del cromosoma Y que determina la formación de testículos), el proceso de diferenciación sexual depende de las hormonas (Arnold & Gorski 1984; Morris et al. 2004; Simerly 2005; McCarthy 2008).

El factor clave son los efectos masculinizante y desfeminizante de la testosterona, producidos por activaciones transitorias de los testículos durante un periodo crítico en el desarrollo (Zuloaga et al. 2008). La testosterona entra libremente al cerebro y en ciertas regiones su eficacia para moldear el cerebro masculino se basa principalmente en su conversión a estradiol a través de la enzima local aromatasa (Zuloaga et al. 2008).

Los receptores a estrógeno influyen en procesos como neurogénesis, apoptosis y migración con lo que imprimen diferencias sexuales en el número de células y en su distribución en núcleos específicos. Adicionalmente, influyen en la extensión de las neuritas, la

sinaptogénesis y el establecimiento de un patrón neuroquímico que determina diferencias sexuales en las vías de proyección, la densidad de inervación, la conectividad y el control de neurotransmisores en regiones cerebrales específicas (Simerly 2005; Wilson & Davies 2007; Forger 2009; Tobet et al. 2009).

Como resultado, los cerebros masculino y femenino se desarrollan en ambientes hormonales muy diferentes; consecuentemente, se cree que sin la exposición a la testosterona, el cerebro de animales y humanos seguiría líneas de desarrollo femeninas. El cerebro del adulto sexualmente caracterizado podría ser diferenciado por las acciones activadoras de los esteroides sexuales. Las diferencias sexuales podrían generarse por la testosterona perinatal, pero no necesariamente se manifiestan funcionalmente sino hasta la pubertad, cuando los circuitos cerebrales preformados pertinentes, se activan por el cambio en el ambiente de las hormonas gonadales.

La implicación principal de las diferencias que permanecen en el tejido nervioso de machos y hembras es una organización estructural diferente y que va a verse reflejada en una organización funcional sexualmente dimórfica. A continuación se mencionan algunos ejemplos de las estructuras cerebrales en las que se han encontrado diferencias entre hombres y mujeres que pueden deberse al efecto organizador de los esteroides sexuales.

2.7.1.1 Dimorfismo en la estructura cerebral

Estudios anatómicos *postmortem* y de neuroimagen han revelado diferencias sexuales estructurales y ultraestructurales en la organización cerebral del ser humano en sistemas neurales involucrados en la cognición. Estas diferencias morfológicas proporcionan un substrato diferente en la organización cerebral lo que puede estar relacionado con las diferencias conductuales observadas entre sexos.

El cerebro de machos y hembras no sólo difiere en el tamaño y peso, corregido con la proporción del peso corporal y tamaño de la cabeza, sino en estructuras cerebrales que no están directamente relacionadas con la conducta reproductiva. Los hombres presentan mayor volumen intracraneal (Filipek et al. 1994; Allen et al. 2003) y lóbulos más grandes que las mujeres (Nopoulos et al. 2000), mientras que la frecuencia de los surcos y los giros en las regiones frontales y parietales es menor en hombres que en mujeres (Luders et al. 2004). Los hombres

presentan mayor volumen en cerebelo (Filipek et al. 1994) y en la corteza de asociación parietal (Davatzikos & Bryan 2002), estructuras relacionadas con la habilidad motora y espacial, mientras que las mujeres presentan mayor volumen cortical (Goldstein et al. 2002) y en el núcleo caudado (Filipek et al. 1994). La amígdala (Goldstein et al. 2002), el hipotálamo y la región frontomedial (Goldstein et al. 2002) relacionadas con el procesamiento emocional son más grandes en hombres, mientras que otras áreas involucradas con la emoción como la corteza orbitofrontal (Gur et al. 2002) y la región paralímbica medial así como el hipocampo (Filipek et al. 1994) son más grandes en mujeres (Goldstein et al. 2002).

Se sabe que los hemisferios cerebrales no son simétricos, independientemente del sexo. Esta asimetría cerebral también difiere entre hombres y mujeres. En general, los cerebros masculinos tienen una mayor asimetría que los femeninos. Las asimetrías del lado izquierdo son más grandes en hombres en el *planum* temporal (Good et al. 2001), el giro temporal superior (Kovalev et al. 2003) el lóbulo parietal inferior (Frederikse et al. 1999), el tálamo y la región posterior del cíngulo (Kovalev et al. 2003). Sin embargo, hay datos contradictorios que revelan que la asimetría izquierda del *planum* temporal sólo se presenta en las mujeres (Knaus et al. 2004).

El dimorfismo sexual anatómico se extiende a la composición del tejido cerebral. La proporción materia gris/materia blanca es mayor en mujeres que en hombres (Filipek 1994; Luders 2004), especialmente en la corteza dorsolateral prefrontal y el giro frontal superior (Schlaepfer et al. 1995). Las comisuras interhemisféricas difieren entre hombres y mujeres; el cuerpo calloso es mayor en mujeres que en hombres especialmente en el esplenio (Dubb et al. 2003), en el istmo (Gadea et al. 2002) y en la región posterior (Salat et al. 1997; Gadea et al. 2002). La comisura anterior también es mayor en mujeres y la presencia de la adherencia intertalámica es más frecuente en mujeres que en hombres (Allen & Gorski 1991). Aunque hay estudios en los que no encuentran diferencias (Bishop & Wahlsten 1997) o que los hombres presentan un cuerpo calloso más grande, especialmente en la rodilla (Dubb et al. 2003).

La asimetría hemisférica se ha visto correlacionada con el tamaño del cuerpo calloso en hombres pero no en mujeres, lo que sugiere un decremento en la conectividad interhemisférica con un incremento en la asimetría hemisférica dependiente del sexo (Dorion et al. 2000).

2.7.1.2 Dimorfismo en la organización funcional cerebral

Los cambios observados en la anatomía cerebral pueden verse reflejados en la organización funcional del cerebro dando como resultado un probable patrón conductual diferente entre hombres y mujeres.

Se han observado asimetrías funcionales en la organización cerebral entre hombres y mujeres con PET y SPECT en la exploración de la tasa metabólica cerebral y el flujo sanguíneo cerebral en estado de reposo (Rodríguez et al. 1988; Gur & Gur 1990; Gur et al. 1995; Kastrup et al. 1999; Li et al. 2004). De manera general, estas investigaciones sugieren que las mujeres tienen un flujo sanguíneo cerebral mayor que los hombres (Kastrup et al. 1999). Estudios de imágenes funcionales incluyendo estudios con RMf han investigado la influencia del sexo en los cambios de la actividad cerebral durante la presentación de estímulos.

Las tareas de rotación mental, estimulación visual, reconocimiento emocional, procesamiento verbal y construcción de objetos muestran patrones de activación diferenciales entre sexos (Shaywitz et al. 1995; Levin et al. 1998; Cowan et al. 2000; Ragland et al. 2000; Speck et al. 2000; Georgopoulos et al. 2001; Weiss et al. 2003; Fischer et al. 2004; Lee et al. 2002, 2005). Se han observado cambios en la actividad cerebral dependientes del sexo en la ínsula y el tálamo (Lee et al. 2002, 2005), la corteza occipital y el giro del cíngulo (Fischer et al. 2004; Lee et al. 2002), regiones frontales (Lee et al. 2002), parietales (Weiss et al. 2003) y temporales (Ragland et al. 2000), así como una lateralización hemisférica (Shaywitz et al. 1995; Levin et al. 1998; Speck et al. 2000; Georgopoulos et al. 2001; Lee et al. 2002). A pesar del consenso general que sugiere diferencias entre hombres y mujeres, no todos los estudios encuentran diferencias sexuales (Schlosser et al. 1998).

Estudios cognoscitivos con RMf señalan que las mujeres tienen mayor activación bilateral durante tareas de lenguaje fonológico (Shaywitz et al. 1995), y mayor especialización del hemisferio izquierdo durante tareas de memoria de trabajo (Speck et al. 2000). Adicionalmente, las mujeres han mostrado mayor activación frontal comparada con una activación parietal en hombres, durante tareas de rotación mental (Weiss et al. 2003); los hombres han mostrado una preferencia de activación del hemisferio derecho, mientras que las mujeres del hemisferio izquierdo durante tareas que requieren hacer un juicio de todo el objeto

desde sus partes (Georgopoulos et al. 2001). Finalmente, las mujeres han demostrado mayor flujo sanguíneo cerebral bilateral en regiones del lóbulo temporal durante la ejecución de la tarea de recuerdo libre de la escala de memoria Wechsler (Ragland et al. 2000).

Aunque existen algunas discrepancias entre los hallazgos, posiblemente se deban a diferencias en metodología, estímulos, tareas y técnicas de registro, la evidencia con neuroimagen muestra datos en la organización funcional del cerebro en reposo y durante tareas cognitivas, consistentes con evidencia conductual y clínica. Emergen tres patrones principales de diferencias sexuales en la organización funcional cerebral, los hombres presentan mayor lateralización hemisférica y asimetría cerebral que las mujeres, las mujeres activan redes más extensas que los hombres, y finalmente, hombres y mujeres utilizan sistemas neurales diferentes para ejecutar las mismas tareas y en muchos de los casos para llegar a los mismos resultados conductuales.

No todas las diferencias entre hombres y mujeres se explican por el efecto organizador de los esteroides sexuales. A continuación se presenta la influencia de cambios transitorios relacionados con los esteroides sexuales que pueden influir en el funcionamiento cerebral y en la conducta.

2.7.2 Efectos activadores de los esteroides sexuales

Los efectos activadores de los esteroides sexuales se pueden definir como la ocurrencia de una respuesta conductual específica en presencia de una hormona definida. Son acciones transitorias de las hormonas, generalmente en el cerebro adulto.

Las hormonas sexuales predominantes después de la pubertad son los estrógenos en las hembras y la testosterona en los machos. Las diferencias sexuales también pueden explicarse por el resultado de las diferencias en los niveles de hormonas gonadales que prevalecen en los adultos. Por ejemplo, en humanos y en especies animales utilizadas en investigación, la administración de andrógenos a hembras induce aspectos conductuales típicos de los machos que regresan a la normalidad una vez que termina el tratamiento hormonal; se sabe que el aspecto cíclico de las hormonas ováricas influye en diferentes conductas (Kelly et al. 1999; Halpern & Tan 2001; Cahill 2006; Wilson & Davies 2007; Goldstein et al. 2010) como se verá en la siguiente sección. Estos efectos son llamados activadores (Arnold & Breedlove 1985; Williams

1986) o respuestas moduladas hormonalmente (McCarthy & Konkle 2005), las cuales dictan diferencias sexuales en un nivel molecular, celular y funcional.

2.7.2.1 Ciclo menstrual

Aunado a las diferencias entre hombres y mujeres, la producción de hormonas sexuales durante el ciclo menstrual ha sido implicada en diferencias funcionales del SNC. Se sabe que el efecto de las hormonas sexuales no se limita a la conducta sexual sino que tiene implicaciones en diferentes condiciones como en la actividad locomotora (Copeland et al. 2004; Lightroot 2008), en diferentes tareas cognoscitivas (Solis-Ortiz et al. 2004; Solis-Ortiz & Corsi-Cabrera 2008), en la respuesta a condiciones estresantes (Fernandez-Guasti et al. 1999; Kajantie & Phillips 2005) y en la prevalencia de desórdenes psiquiátricos (Naninck et al. 2011). Numerosos estudios clínicos revelan que las mujeres padecen con mayor frecuencia de desórdenes de ansiedad y depresión que los hombres, y que la respuesta neuroendocrina al estrés y en situaciones de reto difiere también para cada sexo (Pigot 1999).

Un considerable número de mujeres reporta experimentar cambios transitorios en la eficiencia intelectual y en el estado de ánimo asociados al ciclo menstrual, lo cual es apoyado por datos experimentales. Las habilidades cognoscitivas asociadas a las diferencias de género oscilan en función del ciclo menstrual. Las habilidades favorecidas en las mujeres como la coordinación motora fina, la fluencia verbal y la memoria espacial muestran un mejoramiento durante el periodo periovulatorio o la fase lútea temprana cuando los niveles de estrógeno y progesterona son altos, mientras que al mejorar la ejecución en tareas de habilidad espacial, las habilidades verbal y manual se deterioran (Hampson 1990). La atención espacial también cambia a lo largo del ciclo hormonal; se observa una lateralización mayor durante la fase menstrual, mientras que predomina un patrón bilateral en la fase lútea intermedia, cuando aparecen los niveles más altos de progesterona (Hausmann & Gurtunkun 2000). El componente atencional y la memoria de trabajo en tareas visoespaciales se ve favorecido por la presencia de estrógeno en la fase ovulatoria (Beaudoin & Marrocco 2005).

Son pocos los estudios que exploran las funciones del lóbulo frontal durante diferentes fases del ciclo menstrual. Se ha reportado una peor ejecución durante la fase premenstrual en la generación de números aleatorios correlacionada con los síntomas premenstruales reportados

(Brugger et al. 1993), y en la tarea de Stroop en la que hay interferencia en el procesamiento de los estímulos (Lord & Taylor 1992), mientras que durante la fase folicular se ha encontrado una mejor ejecución de esta tarea (Kennan et al. 1992). En un experimento con registro simultáneo de la actividad EEG y la ejecución de la tarea de *Wisconsin Card Sorting Test*, que demanda la participación de funciones prefrontales específicas, se encontró una mejor ejecución en la fase lútea temprana cuando la progesterona tiene niveles altos y durante la fase menstrual cuando los niveles hormonales son los más bajos asociada con una reducción de la potencia de alfa, y una peor ejecución durante la fase lútea tardía asociada con una disminución en la potencia de las oscilaciones rápidas (Solís-Ortiz et al. 2004).

Explorando la actividad metabólica con PET durante esta misma tarea, los sujetos presentaron una tendencia a ejecutar mejor durante la administración de progesterona o estrógeno asociada con activación de áreas involucradas en el procesamiento cognoscitivo como la corteza dorsolateral prefrontal, el lóbulo parietal inferior y la región posterior del lóbulo temporal inferior, en contraste con el patrón de activación atenuado observado en las mismas áreas cuando se administró un nanopéptido sintético para suprimir la secreción de esteroides gonadales (Berman et al. 1997).

Los datos experimentales mencionados anteriormente sumados al reporte subjetivo que las mujeres expresan dificultad para iniciar actividades y afrontar situaciones de reto o problemas, el aumento de distracción y la falta de concentración en la fase premenstrual, sugieren cambio transitorios en las funciones ejecutivas de la corteza frontal, probablemente relacionada con la influencia de esteroides sexuales en esta región cortical.

Durante el ciclo menstrual también se han observado cambios en el estado de ánimo y síntomas afectivos como ansiedad, depresión e irritabilidad (Kennan et al. 1992; Rubinow & Schmidt 2006). Ciertas oscilaciones EEG se correlacionan con el auto-reporte del nivel de ansiedad a lo largo del ciclo menstrual; niveles altos de ansiedad se asocian con incremento de la actividad alfa, lo cual es consistente con lo reportado después de la administración de BZDs (Kinoshita et al. 1994) y con estímulos estresantes (Gauthier et al. 1980; Ramos & Corsi-Cabrera 1989); mientras que niveles bajos de ansiedad se asocian con actividad theta y acoplamiento temporal bajos, especialmente en el hemisferio derecho (Solís-Ortiz & Corsi-Cabrera 2002).

En la neuroquímica también se han encontrado fluctuaciones. El nivel de GABA en la corteza visual medido con espectroscopía decae de la fase folicular a las fases lútea intermedia y tardía (Epperson et al. 2002), mientras que el nivel de GABA medido en plasma aumenta de la fase folicular media a la lútea tardía (Halbreich et al. 1996).

2.7.3 Esteroides sexuales en el cerebro

En el SNC los esteroides sexuales tienen un efecto genómico incrementando la transcripción de genes específicos y otro no genómico al modular la neurotransmisión actuando directamente en la membrana de los receptores, como las progestinas (Majewska 1992), o interactuando indirectamente, como en el caso del estrógeno, con segundos mensajeros, factores de transcripción (McEwen 2001; Olesen & Auger 2005) y vías rápidas de señalización (Pawlak & Beyer 2005). Los esteroides sexuales podrían afectar la estructura neuronal y la conectividad por acciones genómicas y alterar la conectividad funcional modulando la excitabilidad neural por sus acciones no genómicas.

En diversas investigaciones dirigidas a conocer el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas se han identificado procesos celulares y moleculares específicos en diferentes regiones cerebrales ligados a funciones específicas. Estos procesos incluyen transducción de señales (Kow et al. 1994); plasticidad estructural involucrando sinaptogénesis (Carrer & Aoki 1982), retracción y expansión de dendritas y espinogénesis (Mukai et al. 2011), muerte neuronal y neurogénesis (Gould & McEwen 1993) y la regulación hormonal de la expresión de genes de neuropéptidos (Harlan 1988; Akesson & Micevych 1995)

La progesterona se considera una hormona sexual femenina por producirse en el cuerpo lúteo del ovario, principalmente en la segunda mitad del ciclo menstrual (Amado & Flórez 2005). Esta hormona se sintetiza a partir del colesterol y su función más conocida es la reproductiva. Sin embargo, la progesterona y sus metabolitos también son sintetizados en el cerebro por las células gliales (Jung-Testas et al. 1996) y en el SNP por las células de Schwann (Baulieu et al. 1996).

Se ha mostrado que neuronas de la corteza cerebral, el estriado, el *septum*, la amígdala, el hipotálamo y la amígdala también sintetizan progesterona (Majewska et al. 1986; Nabekura et al. 1986; Tsutsui & Yamazaki 1995; Baulieu et al. 1996; Mensah-Nyagan et al. 1999). Los

receptores a progesterona se han descrito en el hipotálamo, el septum, el estriado, el hipocampo y la amígdala (Hagihara et al. 1992; Shughrue et al. 1992), en la sustancia *nigra*, en el núcleo supraquiasmático y en la corteza cerebral (Shughrue et al. 1992), se han encontrado más expresados en la corteza frontal y son más abundantes en la hembra adulta (Maggi & Zucchi 1987), estando presentes desde el séptimo día postnatal (Kato & Onouchi 1981), lo que sugiere un amplio espectro de la actividad biológica de la progesterona vinculada con diversos patrones conductuales, como se verá más adelante.

En la fase folicular la pregnenolona formada a partir del colesterol en el ovario sigue otra vía formando 17α -hidroxipregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenodiona y testosterona para finalmente convertirse en el estrógeno 17β -estradiol (Amado & Flórez 2005). En la fase folicular la hormona folículo estimulante detona la secreción de 17β -estradiol. También en los testículos se secretan estrógenos en pequeñas cantidades por aromatización de la testosterona (Ravizza et al. 2003).

Los receptores a estrógenos se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, tanto en las neuronas como en la célula glial y no están restringidos a regiones relacionadas con las funciones reproductivas. La naturaleza de estos receptores y su posible mecanismo de acción que intervienen en el dimorfismo sexual en la conducta reproductiva han sido ampliamente estudiados (ver McEwen 2001; Gilles & McArthur 2010). Los receptores a estrógenos localizados en las neuronas, se expresan tanto en el núcleo celular en donde afectan la expresión de ciertos genes, como en el citoplasma fuera del núcleo donde pueden influir en diversos eventos celulares y modular la neurotransmisión.

La expresión de receptores a estrógenos en roedores se ha detectado en la corteza cerebral (Simerly et al. 1990) incluyendo áreas de asociación como la corteza prefrontal en primates (Panek & Dixon 1986) y las cortezas dorsolateral prefrontal y parietal en humanos (Perlman et al. 2005); también se han encontrado en redes que controlan el movimiento (Ravizza et al. 2003); en regiones del sistema límbico y memoria (Simerly et al. 1990; Blurton-Jones et al. 1999; Ravizza et al. 2003); en las vías dopaminérgica y serotoninérgica (Creutz & Kritzer 2002; Sheng et al. 2004); entre otras regiones.

En resumen, los receptores a estrógenos se encuentran estratégicamente ubicados para influir en los procesos cognitivos, memoria, emoción, motivación y en la activación cerebral global.

2.7.3.1 Interacción de los esteroides sexuales y el GABA

Diversas líneas de investigación han mostrado interacciones de los esteroides sexuales con el sistema GABAérgico. El estradiol y la progesterona incrementan el número de sitios en los que se une el muscimol (agonista a GABA_A) en diferentes áreas cerebrales de ratas ovariectomizadas (Maggi & Perez 1984; Perez et al. 1988). En contraste, la administración de estrógeno no produjo un cambio sustancial en los receptores a GABA en machos castrados, lo que sugiere un dimorfismo sexual en la sensibilidad del sistema GABAérgico a las hormonas esteroideas (Perez et al. 1986). Hay evidencia que sugiere que los estrógenos interactúan con la GAD (enzima esencial para la síntesis de GABA).

Se ha descrito que la pregnanolona (3 α -hidroxi-5 β -pregnano-20-ona) y la alopregnanolona (3 α -hidroxi-5 α -pregnano-20-ona), metabolitos de la progesterona, tienen diversos efectos similares a los producidos por las BZDs y los barbitúricos tales como: anestésicos (Norberg et al. 1999), hipnóticos (Lancel 1996) anticonvulsivos y ansiolíticos (Beyer & González-Mariscal 1991; Bitran et al. 1991; 1993; Rodríguez-Sierra et al. 1984; Picazo & Fernández-Guasti 1995; Puia et al. 1990). Estos metabolitos pueden modular las acciones inhibitoras del GABA y de las BZDs potenciando los efectos GABAérgicos al aumentar la entrada de Cl⁻ a través de los receptores ionotrópicos GABA_A y al incrementar la unión de ciertas BZDs como el flunitrazepam (Majewska et al. 1992; Picazo & Fernández-Guasti 1995; Gee et al. 1998).

El efecto anestésico en ratas es potenciado por la pregnanolona (Norberg et al. 1999) y la sensibilidad al triazolam se incrementa por la administración de progesterona en mujeres (Kroboth & McAuley 1997). Se ha reportado que el efecto ansiolítico producido por la progesterona y la alopregnanolona es bloqueado por antagonistas GABAérgicos como: el flumazenil, la picrotoxina y la bicuculina (Fernández-Guasti & Picazo 1995; Britan & Dowd 1996).

La producción de alopregnanolona se observa en ambos sexos luego de la administración de dosis fisiológicas de progesterona (Corpechot et al. 1993). Los niveles tanto de progesterona como de alopregnanolona se incrementan dramáticamente en ambos sexos luego de exponerlos a estímulos estresantes (Schulz et al. 1996; Purdy et al. 1991; Vallée et al. 2000; Barbaccia et al. 2001). Los niveles cerebrales de alopregnanolona en el macho se ven incrementados de un nivel que en las hembras equivale al diestro a niveles que corresponden al proestro en las hembras (Purdy et al. 1991).

Finalmente, el síndrome de abstinencia generado cuando se retiran los neuroesteroides se caracteriza por un incremento en la susceptibilidad a crisis convulsivas (Frye & Bayon 1998; Smith et al. 1998a; Reilly et al. 2000), incremento en la ansiedad (Gallo & Smith 1993; Smith et al. 1998a) y desde el punto de vista farmacológico un decremento en la sensibilidad a las BZDs (Moran et al. 1998; Smith et al. 1998a; Smith et al. 1998b).

2.7.4 Influencias hormonales versus genéticas

Por muchos años, se pensó que el único factor biológico para determinar la diferenciación sexual en el cerebro y otros tejidos eran las influencias organizadoras y activadoras de los esteroides sexuales, como se explicó anteriormente. Evidencia reciente muestra que los factores genéticos tienen que ser tomados en consideración, especialmente la influencia de genes sexuales específicos en los cromosomas sexuales (De Vries et al. 2002; Arnold et al. 2003, 2009; De Vries 2004; De Vries & Södersten 2009). Los efectos de los cromosomas sexuales podrían deberse a la acción directa de los genes del cromosoma Y o una expresión diferencial de los genes del cromosoma X que puede surgir de diferencias de la producción del gen ya que no todos los genes del segundo cromosoma X de las hembras son completamente silentes, o a diferencias sexuales en la impronta genómica de los genes del cromosoma X (Federman 2006; van Nas et al. 2009).

Se han encontrado diferencias sexuales antes de la diferenciación de las gónadas, o antes de que el nivel de testosterona en sangre sea sexualmente dimórfico (Renfree & Short 1988; Dewing et al. 2006). Por lo que algunos investigadores (De Vries et al. 2002; Arnold et al. 2003, 2009; De Vries 2004; De Vries & Södersten 2009) han retomado la idea de que las diferencias

genéticas intrínsecas a las células cerebrales de machos y hembras podrían ser el origen de algunas diferencias sexuales en el fenotipo.

El primer estudio en identificar que el gen Y tiene un efecto directo en el fenotipo del cerebro utilizó un modelo en roedores en el cual se redujo la expresión del gen Sry, lo que disminuyó la expresión de tirosina hidroxilasa (enzima crítica para la síntesis de catecolaminas como la dopamina) en las células dopaminérgicas de la sustancia *nigra* y el estriado, interfiriendo con la función motora (Dewing et al. 2006).

Hay datos que apoyan la noción de que ciertas diferencias sexuales existen para preservar funciones cerebrales críticas que tienen una ventaja evolutiva (De Vries et al. 2002; Arnold et al. 2003; 2009; De Vries 2004). Por ejemplo, se han encontrado diferencias sexuales en los patrones cerebrales sin encontrar diferencias en la ejecución (Shaywitz et al. 1995; Grabowski et al. 2003; Piefke et al. 2005). Esto no sería inesperado si consideramos que en ambos sexos, el cerebro se esfuerza por lograr una ejecución óptima en las funciones cognitivas, pero esto tiene que suceder en ambientes genéticos y hormonales muy diferentes, tanto durante el desarrollo como en la adultez, que tiene que existir para asegurar la sobrevivencia de la especie. El dimorfismo sexual que subyace a las funciones no reproductivas podría habilitar al organismo a lograr las mismas metas pero por medio de mecanismos cerebrales diferentes en machos y hembras (De Vries et al. 2002).

2.7.5 Efecto de las benzodiazepinas en la función cerebral

La mayoría de los estudios encaminados a investigar el efecto diferencial de las BZDs en hombres y mujeres se centran en la farmacodinamia y farmacocinética (Yonkers 1992; Greenblatt et al. 2000; 2004). No se han encontrado diferencias sexuales en la absorción, pero sí en la eliminación, siendo más corta en los hombres que en las mujeres (Yonkers 1992; Greenblatt et al. 2000; 2004; aún después de normalizar los datos con el peso corporal (Greenblatt et al 2000), resultados atribuidos a las diferencias encontradas en las enzimas CYP encargadas de metabolizar diversos fármacos psicotrópicos (Thummel & Wilkinson, 1998).

Conductualmente se ha reportado un deterioro psicomotor (Palva 1985), y una afectación en la estimación temporal y en los tiempos de reacción (Sierra 1997) mayor en mujeres que en hombres bajo los efectos de una dosis de diazepam. Las mujeres mostraron un deterioro mayor

en la ejecución de la tarea de sustitución de dígitos tras la administración de lorazepam, en comparación con hombres (Jackson et al. 2005).

En dos estudios doble ciego administrando diazepam vía oral y placebo de manera contrabalanceada se registró el EEG en reposo (Romano-Torres et al. 2002) y durante una tarea de atención sostenida (Muñoz-Torres 2005). Se analizó el espectro de potencia y los espectros de actividad inter e intrahemisférica o actividad acoplada en la condición de reposo con ojos abiertos en un experimento y en el otro experimento 1 segundo previo a la aparición del estímulo al que tenían que responder.

Durante reposo con ojos abiertos sólo las mujeres mostraron un decremento de la potencia de *theta* y alfa 2. Esta disminución de *theta* encontrada en mujeres y no en hombres concuerda con los datos encontrados en ratas hembras gonadectomizadas sin tratamiento hormonal y en ratas hembras gonadectomizadas recibiendo progesterona pero no entre los machos (Ugalde et al. 1998). En contraste, la correlación interhemisférica se vio más afectada en los hombres, quienes mostraron un decremento de la correlación interhemisférica de alfa 1. Estos datos sugieren que el ritmo *theta* es más sensible al diazepam en mujeres, mientras que el efecto del DZ en el acoplamiento temporal entre regiones homólogas del cerebro es mayor en hombres que en mujeres. El ligero efecto observado en el acoplamiento temporal en mujeres puede relacionarse a las diferencias sexuales en la organización funcional y anatómica del cerebro. Las mujeres tienen la comisura anterior (Allen & Gorski 1991) y el cuerpo calloso (Salat et al. 1997; Gadea et al. 2002; Dubb et al. 2003) más grandes y mayor correlación interhemisférica (Beaumont et al. 1978; Corsi-Cabrera et al. 1989, 2003; Ramos et al. 1993) en comparación con los hombres en condiciones normales. La mayor interconectividad entre los dos hemisferios cerebrales podría resultar en un acoplamiento funcional mayor en mujeres que en hombres, como ocurre luego de la privación de sueño; la correlación interhemisférica decrece en los hombres, mientras que en las mujeres se observa atenuado el efecto en la correlación interhemisférica (Corsi-Cabrera et al. 1989; 2003).

El análisis de la actividad EEG durante una tarea que demanda atención sostenida bajo los efectos del diazepam en hombres y mujeres reveló, que el efecto dimórfico del diazepam observado en la actividad *theta* en mujeres se mantiene durante la ejecución de la tarea, exclusivamente las mujeres mostraron un decremento de la potencia de *theta* y *alfa*. El efecto

selectivo en el hemisferio derecho del acoplamiento temporal intrahemisférico durante reposo, se observó durante la ejecución de la tarea sólo en las mujeres, mientras que en los hombres decreció globalmente la actividad intrahemisférica.

En resumen, las BZDs tienen un efecto diferencial en hombres y mujeres que necesita ser más explorado, correlacionándolo con el funcionamiento cerebral para entender mejor los mecanismos cerebrales que subyacen al cambiar la neuroquímica del sistema nervioso. Resulta fundamental entender la interacción entre las BZDs y los mecanismos cognoscitivos complejos que exige la vida cotidiana, así como el efecto diferencial que ocurriría entre hombres y mujeres por tener una organización estructural y funcional del cerebro diferente. El conocimiento de los mecanismos cerebrales involucrados va a permitir desarrollar estrategias terapéuticas más congruentes con el funcionamiento de un cerebro masculino y femenino, y por lo tanto más efectivas. Desde el punto de vista teórico permite tener un entendimiento más completo de la función cerebral que subyace a la conducta.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los procesos cognoscitivos complejos el SNC requiere integrar la información proveniente de múltiples entradas sensoriales obligando al sistema a responder con patrones muy precisos tanto temporal como espacialmente en las respuestas inhibitorias y excitadoras. Las funciones cognoscitivas complejas, específicamente el seguimiento de reglas en un contexto cambiante, demanda la participación de regiones en las que se expresan receptores a BZDs. Las BZDs como el diazepam (DZ) se unen al receptor postsináptico GABA_A incrementando la inhibición a través del flujo de los iones de Cl⁻ al interior de la neurona.

La mayoría de los estudios que exploran los efectos cognoscitivos de las BZDs no registran la actividad cerebral asociada al incremento de la inhibición a través del sistema GABAérgico; o registran los cambios que ocurren en el cerebro bajo el efecto de estas sustancias, pero en condiciones de reposo. Debido a que una demanda cognoscitiva genera un patrón de actividad cerebral completamente diferente al estado de reposo y requiere de un control más preciso de la actividad neural, sobre todo cuando se implementa un conjunto de reglas complejas que demandan inhibir una respuesta motora impulsiva, resulta central conocer cómo se afectan estos procesos con estos fármacos que son ampliamente utilizados.

Es evidente que existen influencias sexuales en todos los niveles del sistema nervioso, desde el genético hasta el conductual. Las diferencias estructurales y funcionales entre hombres y mujeres reportadas en los circuitos neuronales necesarios para el procesamiento de información, la influencia de los esteroides sexuales en el sistema GABAérgico y el dimorfismo genético que pudiera estar interviniendo en las diferencias sexuales apuntan a diferentes organizaciones funcionales del cerebro por lo que resulta importante conocer las similitudes y diferencias de su expresión tanto a nivel conductual como neural.

3.1 Objetivos

- 1) Explorar si una dosis ansiolítica (10 mg) de DZ, afecta la capacidad para seguir reglas complejas.
- 2) Identificar los correlatos neurales relacionados con el efecto del DZ durante la implementación de reglas complejas.

3) Comparar el efecto del DZ entre hombres y mujeres durante el seguimiento de reglas complejas tanto a nivel conductual como a nivel de la actividad cerebral mediante resonancia magnética funcional.

3.2 Hipótesis

La ejecución de la tarea de seguimiento de reglas complejas bajo el efecto del diazepam será menos eficiente que con placebo.

El incremento de la actividad inhibitora, debido a 10 mg de diazepam, reducirá la actividad de la red cerebral implicada en la ejecución de la tarea que demanda seguir reglas complejas. Específicamente, el diazepam inhibirá áreas corticales de asociación como las regiones prefrontal y temporo-parieto-occipital, las cuales son esenciales para la implementación de reglas.

Los cambios cerebrales y conductuales serán más acentuados en las mujeres que en los hombres.

4. MÉTODO

4.1 Sujetos

Participaron 20 voluntarios (10 mujeres) entre 21 y 35 años de edad (media = 25.5 años) con un índice de masa corporal de 23.4 ± 2.9 kg/m² (media \pm desviación estándar) y un porcentaje de grasa corporal normal (del 12 a 21%). Los participantes reportaron haber completado de 14 a 21 años de educación, sin diferencias en el nivel de educación entre hombres y mujeres. A partir de la historia clínica y de una entrevista personal se eligieron a los participantes que no tuvieran historia de neurocirugía, de traumatismo craneo-encefálico, de enfermedad mental o drogadicción, y que no ingirieran sustancias que afectaran el sistema nervioso o el metabolismo del DZ; en el caso de las mujeres, adicionalmente se buscó, que tuvieran ciclos hormonales estables y que no consumieran sustancias que alteraran los niveles de hormonas sexuales, como píldoras anticonceptivas. A todos los sujetos se les pidió abstenerse de ingerir cualquier bebida alcohólica o medicamento 72 hrs antes de las sesiones experimentales. Se les aplicó una prueba de lateralidad (Annett 1967) para asegurar que fueran diestros.

A todos los participantes se les informó por escrito las condiciones del estudio y los que estuvieron de acuerdo en participar firmaron una carta de consentimiento. Los participantes sabían en una de las sesiones se les darían 10 mg de DZ y en otra PL, mientras ejecutaban una tarea cognoscitiva dentro del escáner de resonancia. Se les explicó los efectos del fármaco, así como las condiciones del estudio de resonancia funcional. La investigación fue aprobada por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

4.2 Procedimiento

En la sesión de entrevista se llevaron a cabo las mediciones para asegurar que los participantes cumplieran con los criterios de inclusión. La estimación del porcentaje de grasa corporal se obtuvo a partir del método de pliegues subcutáneos. Con un plicómetro Lange se midieron 4 pliegues: bicipital, tricipital, subescapular y supraciliaco; los cuales representan la grasa de las extremidades y del tronco superior e inferior. Estos pliegues varían de hombres a mujeres, debido a la predisposición natural de cada género para acumular grasa en ciertas zonas por lo que se consultaron tablas nutrimentales específicas para cada sexo (Gibson 1990).

En dos sesiones experimentales diferentes, con un intervalo de 3 a 4 semanas entre ellas, se administró de manera contrabalanceada, una cápsula vía oral ya sea con 10 mg de DZ o con placebo (PL) como control, los sujetos no sabían si el contenido de las cápsulas era PL o DZ. Se registró la actividad metabólica cerebral, a través de imágenes de Resonancia Magnética funcional (RMf), de 2 a 5 hrs después de la administración de la cápsula, periodo en el que la distribución del DZ se encuentra estable (Friedman et al. 1985); durante la realización de una tarea que demanda seleccionar respuestas al implementar reglas arbitrarias bajo el efecto del compuesto (PL o DZ).

A las mujeres se les escaneó entre el 3ro y 5to día del ciclo menstrual, se midieron los niveles séricos de progesterona y estradiol para asegurar que sus niveles de hormonas sexuales correspondieran al inicio de la fase folicular.

A todos los sujetos se les tomó una muestra sanguínea antes o después del estudio de RMf, de manera contrabalanceada, para determinar las concentraciones de DZ por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y de progesterona y estradiol en el caso de las mujeres. Los estudios clínicos fueron realizados en el Laboratorio y Banco de Sangre del Hospital Ángeles del Pedregal. A los participantes se les llevó a su casa al finalizar el estudio para evitar que manejaran bajo los efectos del DZ.

Los datos de 2 sujetos (una mujer y un hombre) fueron excluidos de los análisis debido a que se presentaron problemas técnicos asociados a la presentación de estímulos o captura de sus respuestas en alguna de las sesiones.

4.3 Tarea Cognoscitiva

Durante la adquisición de las imágenes metabólicas cerebrales los sujetos ejecutaron una tarea guiada por reglas complejas diseñada originalmente en el laboratorio.

La tarea consiste en la presentación de un punto de fijación, en el centro de una pantalla y dos cuadros laterales equidistantes, uno a cada lado. Aparece una flecha blanca al centro de la pantalla por 500 ms la cual puede apuntar al lado derecho o al izquierdo, seguida por el estímulo “blanco”, el cual es una cruz verde o roja que aparece por 100 ms en cualquiera de los cuadros mientras la flecha permanece en el centro. En la figura 4.1a se muestra el ejemplo de un ensayo.

La tarea requiere que los sujetos seleccionen entre 2 respuestas diferentes, presionar 2 veces el botón de respuesta (doble *click*) o una vez (inhibir 1 *click*) con el dedo índice derecho tan rápido como les fuera posible, dependiendo del conjunto de reglas a seguir:

- Si la flecha apunta al lugar en el que aparece la cruz y ésta es verde: dar 2 *clicks*
- Si la flecha apunta al lado opuesto a la cruz y es verde: dar 1 *click*, pero
- Si la flecha apunta al lugar en el que aparece la cruz y es roja: dar 1 *click* y
- Si la flecha apunta al lado opuesto a la cruz y es roja: dar 2 *clicks*.

Son cuatro estímulos con diferencias en su congruencia y por lo tanto, en la automaticidad y predominio de la respuesta. Se esperan respuestas más rápidas cuando la flecha está apuntado al estímulo “blanco” que cuando apunta al lado contrario y una facilitación en la respuesta hacia los estímulos verdes que a los rojos, en base al significado tradicional de estos colores: avanzar (verde) y alto (rojo). Así, el ensayo con la flecha apuntando hacia la cruz verde es congruente en sus dos dimensiones (totalmente congruente: CC), el ensayo con la flecha apuntando hacia la cruz roja es incongruente en la dimensión color (CI), el ensayo con la flecha apuntando al lado opuesto de la cruz verde es incongruente en la dirección (DI) y el ensayo con la flecha opuesta a la cruz roja es incongruente en sus dos dimensiones (totalmente incongruente: II). Los ensayos totalmente congruente e incongruente requieren de un doble *click*, mientras que los parcialmente incongruentes demandan inhibir uno de los *clicks* (Fig. 4.1b).

Los estímulos se presentaron pseudo-aleatoriamente con la restricción de que no más de tres estímulos del mismo tipo aparecieran consecutivamente. La tarea contiene 4 bloques de 40 estímulos (10 de cada tipo). Adicionalmente, se presentaron cuatro ensayos “vacíos” en los que no se presenta el estímulo “blanco” (la cruz) sino que luego de la presentación de la flecha cambia al punto de fijación para comenzar de nuevo otro ensayo, por lo que no se requiere seleccionar una respuesta, se presentaron para lograr una distribución estocástica de la presentación de los estímulos y contar con una línea base de activación entre los estímulos. El intervalo entre estímulos es de 4000 ms. La tarea se corrió dentro del escáner con el programa E-Prime (*Psychology Software Tools, Pittsburgh, Pennsylvania*). Las respuestas fueron adquiridas con una botonera compatible con la resonancia magnética.

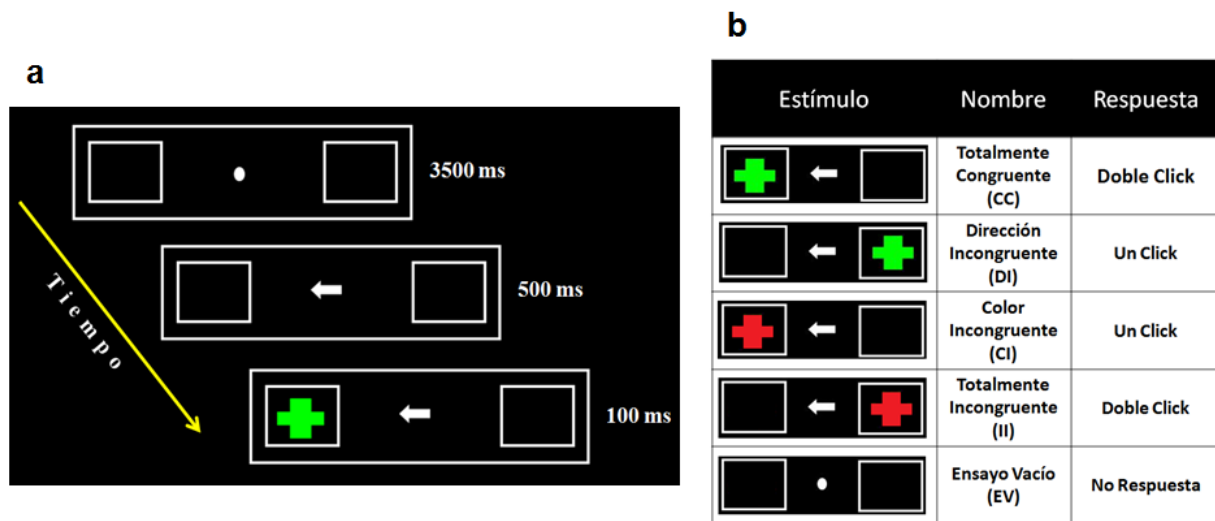


Fig. 4.1 (a) Ejemplo de un ensayo con la duración en milisegundos de cada escena de la tarea, (b) ilustración del tipo de estímulos, el nombre dependiendo de la regla y la respuesta requerida.

4.4 Tarea Motora

Con el propósito de medir el efecto del DZ en la actividad motora, los sujetos ejecutaron previamente a la tarea de seguimiento de reglas, una tarea control diseñada con el objetivo de medir el aspecto motor ya que esta tarea contenía las mismas características sensoriales de los estímulos que la tarea cognoscitiva previamente descrita, pero requería responder con un doble *click* tan rápido como fuera posible cada vez que apareciera el estímulo “blanco” (la cruz), independientemente de su color o localización en relación a la flecha, es decir, siguiendo un solo plan de acción y con una carga cognoscitiva mínima.

Los participantes recibieron las instrucciones de las tareas en el monitor de una computadora y practicaron la tarea fuera del escáner antes de cada sesión de RMf para evitar posibles efectos de memoria a largo plazo y para asegurar que las instrucciones para cada regla eran comprendidas correctamente. La práctica consistió de 1 bloque con 20 estímulos, 5 para cada tipo de regla; si los sujetos tenían más de 2 respuestas incorrectas de uno de los tipos de regla repetían un segundo bloque completo. Únicamente 3 de los 18 sujetos necesitaron un segundo bloque para lograr este criterio.

Tanto la tarea cognoscitiva como la motora se usaron previamente en un grupo independiente con un mayor número de participantes (n=39). Los resultados demostraron tiempos de reacción (TRs) significativamente más lentos para la tarea cognitiva que para la tarea motora, y TRs más rápidos para los estímulos totalmente congruentes en comparación con los otros, los estímulos que tenían al menos un componente incongruente no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Basados en estos datos, y para reducir el número de variables, los estímulos se dividieron en congruentes (o fácil) e incongruentes (o difíciles) para los análisis de RMf.

4.5 Adquisición de las Imágenes de RM

Los datos de RM funcional se adquirieron un sistema General Electric de 1.5 Tesla en el departamento de resonancia magnética del Hospital Ángeles del Pedregal. Para cada sujeto y cada sesión, se adquirieron 240 volúmenes de imagen eco-planar (8 cortes axiales de 6 mm de espesor; TR=3s; TE=27ms; espacio inter-corte de 4mm; FOV: 24x24cm; matriz: 128x128), en cuatro corridas de 60 escaneos con tres escaneos “*dummies*” que fueron descartados antes del análisis debido a efectos de saturación en T1. Previamente a las corridas funcionales, se obtuvo una imagen anatómica T1 de alta definición (TR=18.4ms, TE=4.2ms, tamaño del voxel: 0.47x0.47x3mm³).

Los 8 cortes fueron situados sobre regiones de interés como los lóbulos frontal, parietal, el tálamo, los núcleos basales y el hipocampo (Fig. 4.2). El tercer corte se ubicó paralelo a la línea bicomisural con 2 cortes por arriba y 3 por debajo. El corte más bajo incluyó la región basal de la corteza orbitofrontal, el mesencéfalo, la región superior del cerebelo (culmen) y la corteza visual. El corte más dorsal abarcó el giro frontal superior, los giros pre- y postcentral y la región superior del lóbulo parietal. En la Fig. 4.3 se puede observar el curso del tiempo del experimento acoplado la toma de imágenes de RMf.

4.6 Análisis de Datos

4.6.1 Datos Conductuales

Tanto el tiempo de reacción como el porcentaje de respuestas correctas se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) de tres vías para medidas repetidas con dos niveles de *tarea*

(cognitiva/motora), dos niveles de *droga* (PL/DZ) y cuatro *estímulos* (CC/CI/DI/II). Para comparar las diferencias sexuales se llevó a cabo un ANDEVA mixto de tres vías, por separado para cada tarea, con dos niveles de *sexo* (hombres/mujeres), dos de *droga* y cuatro de *estímulos*.

Se realizaron los análisis post-hoc de Tukey para identificar la fuente de las diferencias estadísticamente significativas entre condiciones. El nivel de significancia fijado fue de $p < 0.05$ para comparaciones estadísticas. Los tiempos de reacción para las respuestas que requerían un doble *click* se calcularon para el primer *click* registrado.

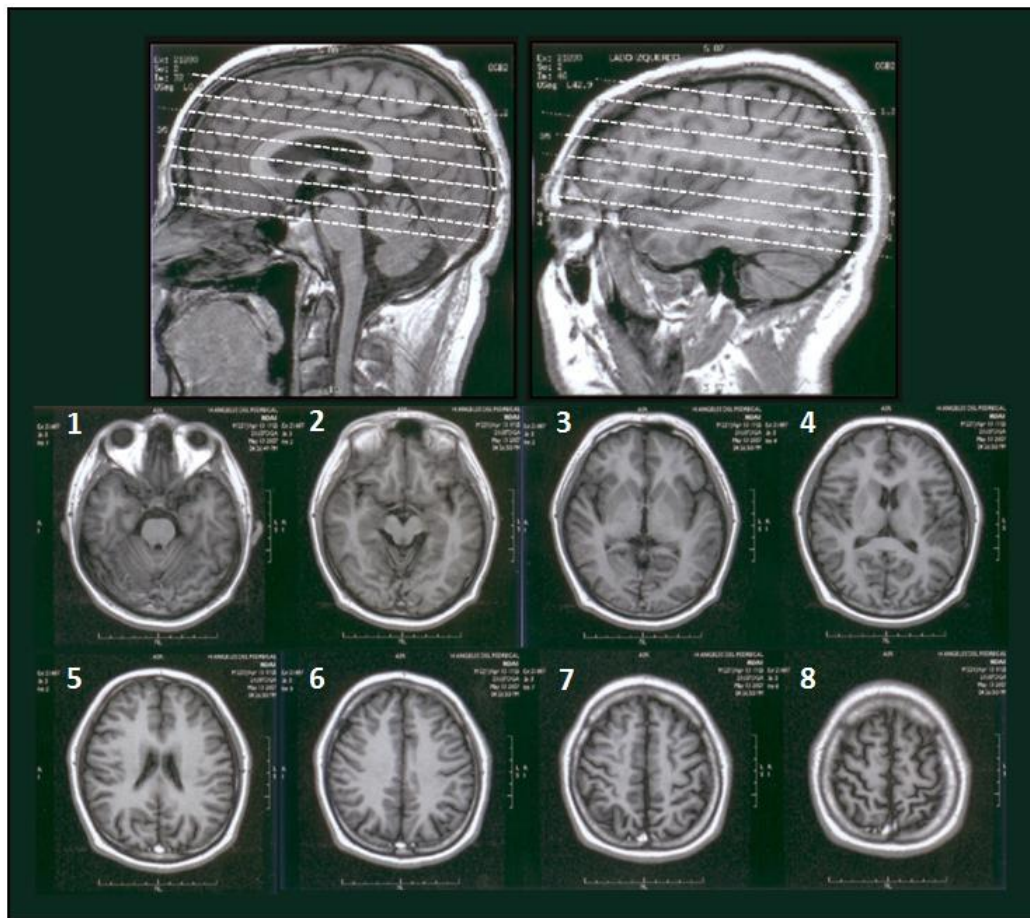


Fig. 4.2 Imágenes anatómicas en las que se muestra la localización de los 8 cortes en una vista sagital y parasagital (arriba), y la vista axial de cada uno de los cortes (abajo).

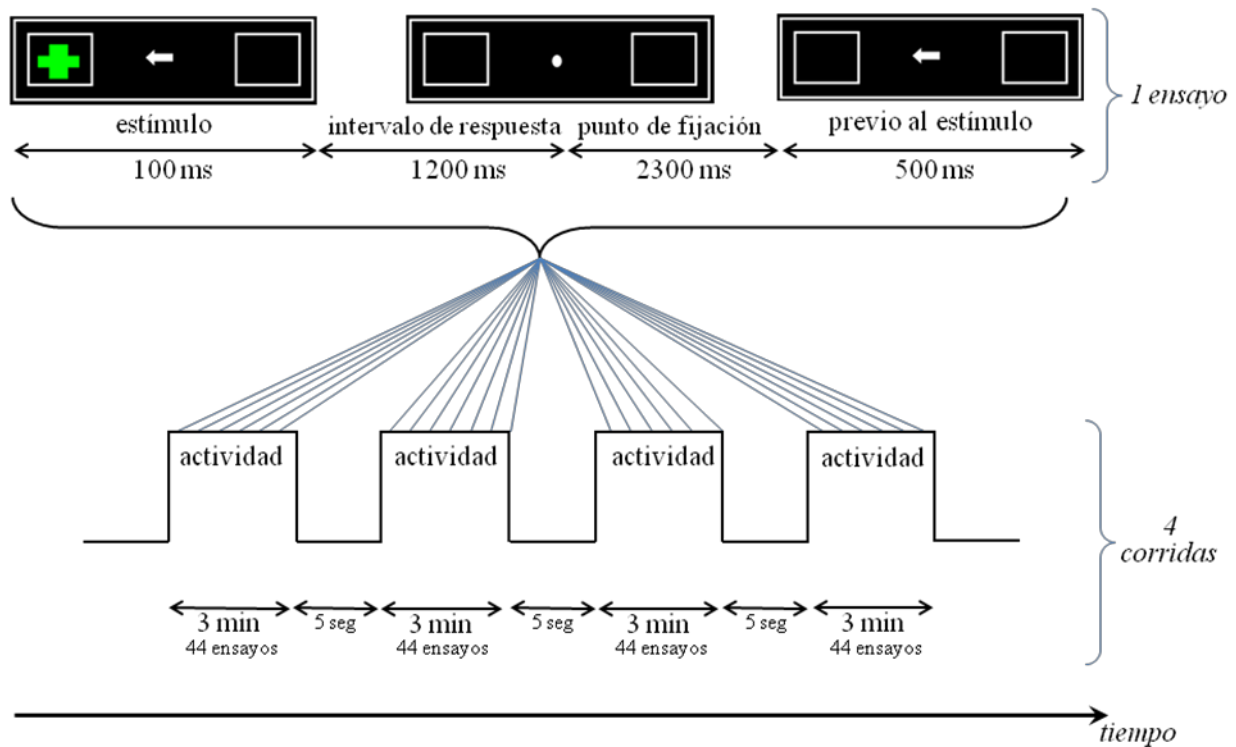


Fig. 4.3 Esquema que muestra el curso del tiempo de la tarea asociado a la adquisición de imágenes de resonancia magnética funcional.

4.6.2 Datos de RMf

Los datos funcionales se pre-procesaron siguiendo procedimientos estándar utilizando el programa SPM2 (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm2). Las imágenes funcionales para cada sujeto se realinearon a la primera imagen de cada sesión para corregir los movimientos de la cabeza entre escaneos y fueron corregidas por diferencias en el tiempo de adquisición del corte. Posteriormente, las imágenes se normalizaron espacialmente a un espacio estándar (Talairach & Tournoux 1988) utilizando la plantilla del Instituto Neurológico de Montreal (Evans et al. 1994). Por último, las imágenes fueron suavizadas espacialmente utilizando un filtro kernel Gaussiano de 8 mm FWHM (*Full-Width at Half-Maximum*). Los datos se modelaron como eventos coincidiendo con la presentación del estímulo “blanco”, con el modelo de respuesta hemodinámica sintética.

Las respuestas cerebrales asociadas con cada condición experimental se estimaron de acuerdo al modelo general lineal para un diseño de eventos para cada voxel (Friston et al. 1995).

Para identificar las regiones asociadas con la ejecución de la tarea de seguimiento de reglas y para comparar estos resultados con reportes previos de neuroimagen durante la conducta dirigida por reglas, primero se analizó la actividad cerebral bajo condiciones normales (placebo). Se calcularon dos contrastes para cada sujeto:

- 1) Las cuatro reglas *versus* los ensayos vacíos.
- 2) Los ensayos incongruentes *versus* el congruente.
- 3) Los ensayos en los que inhiben un click *versus* los ensayos con doble click.

Con el propósito de contrabalancear los contrastes en los que se compararon 3 condiciones contra una, se multiplicó esa condición por 3. A estos contrastes se les aplicó una prueba t de Student en un segundo nivel. El umbral para los mapas estadístico se fijó a $p < 0.001$ no corregido, con un umbral por *cluster* (agrupación de activaciones) de $p < 0.05$.

Para conocer la influencia del DZ en la actividad cerebral en función de la tarea guiada por reglas, se aplicaron pruebas t pareadas comparando los contrastes anteriores entre las condiciones DZ y PL. Finalmente, se aplicaron pruebas post-hoc a los parámetros estimados en los casos en que las interacciones resultaron significativas para conocer el sentido del efecto.

Para investigar las diferencias entre hombres y mujeres se llevó a cabo una t independiente para comparar la actividad entre hombres y mujeres por separado para PL y DZ de los tres contrastes anteriores. Se realizaron pruebas post-hoc de los parámetros estimados para conocer el sentido del efecto de cada condición.

5. RESULTADOS

5.1 Niveles Séricos

La media del nivel plasmático de DZ fue de 170 mcg/ml (DE 55.7), este nivel se encuentra dentro del rango de una dosis clínicamente efectiva (Rang et al. 2001).

Las mujeres presentaron el nivel hormonal correspondiente a la fase folicular temprana: estradiol 41.2 mcg/ml, (DE 36.3); progesterona 1.33 mcg/ml, (DE 3.2).

5.2 Resultados Conductuales

5.2.1 Tiempos de Reacción

La media de los tiempos de reacción de las variables experimentales: *tarea*, *droga* y *estímulos* se muestra en la Fig. 5.1. Los efectos principales de *tarea* y *droga* fueron estadísticamente significativos: los sujetos fueron más lentos en la tarea de seguimiento de reglas que en la tarea motora ($p < 0.0001$) y ejecutaron la tarea más lentamente bajo el efecto de DZ en comparación con PL ($p < 0.0001$), este efecto del DZ sobre los tiempos de reacción sólo se observó en la tarea de seguimiento de reglas ($p < 0.01$ post-hoc) y no en la motora ($p > 0.2$) (Fig. 5.1a). En el efecto principal de *estímulos* se encontró una tendencia ($p = 0.06$) junto con una interacción de *tarea por estímulos* ($p < 0.03$), debida a los tiempos de reacción más lentos para los ensayos incongruentes en comparación con el congruente, exclusivamente en la tarea de seguimiento de reglas ($p < 0.01$ post-hoc) (Fig. 5.1b). La interacción de *droga por estímulos* no alcanzó un nivel estadísticamente significativo ($p = 0.1$).

Para conocer si el aprendizaje ejerce un efecto en la tarea, se hicieron dos análisis con los tiempos de reacción uno entre sesiones (primera y segunda sesión) y otro dividiendo la tarea en mitades (primera y última mitad). No se encontraron diferencias entre *mitades* ($p = 0.91$) ni interacciones con DZ ($p = 0.8$) o con *estímulos* ($p = 0.7$). Si bien se observó un efecto de sesiones ($p < 0.001$), debido a los tiempos de reacción más rápidos en la segunda sesión que en la primera, no se encontraron interacciones con *droga* o *estímulos* ($p = 0.9$).

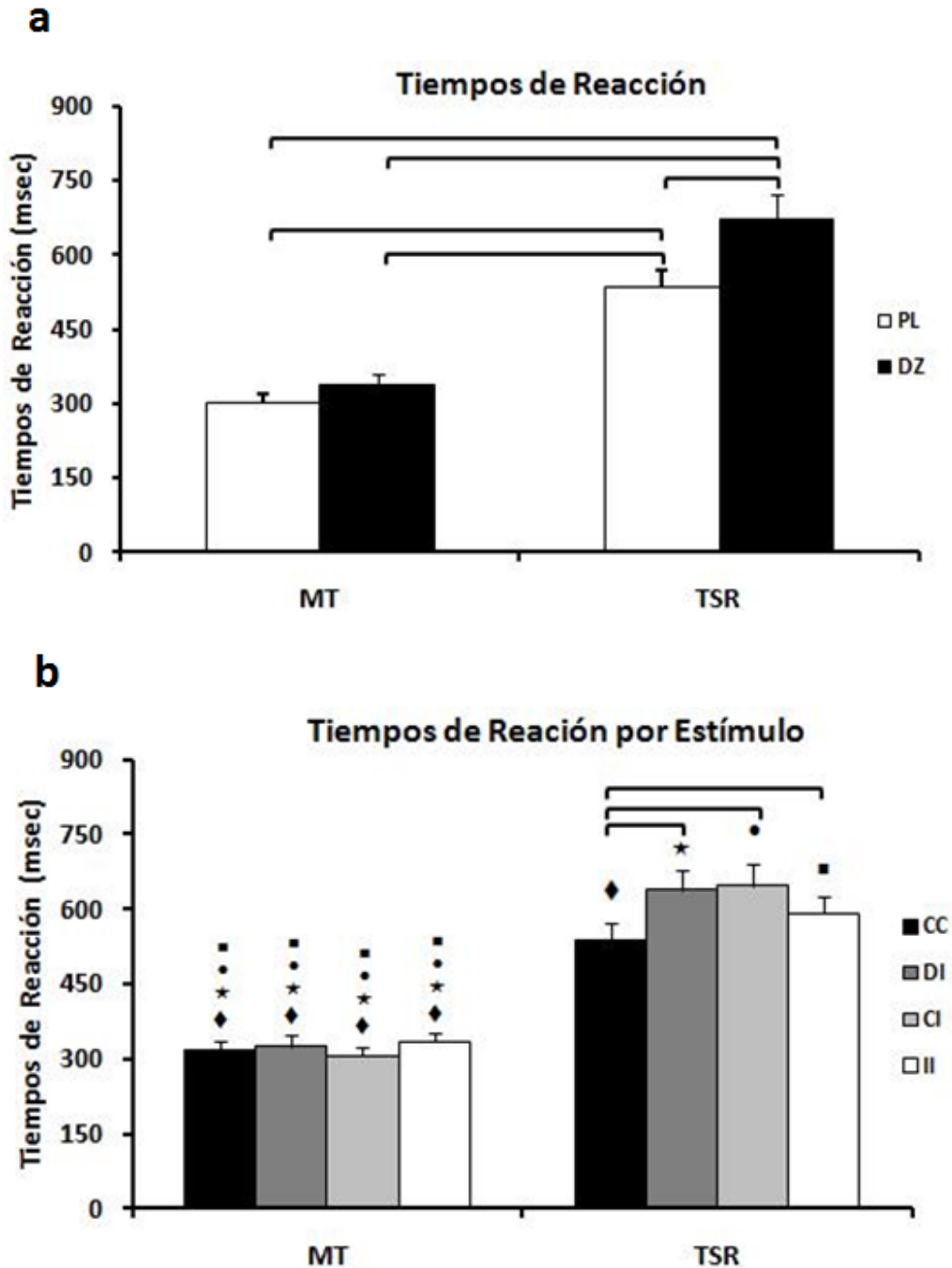


Fig. 5.1 Efectos significativos obtenidos del análisis de los datos conductuales. Medias y errores estándar de los tiempos de reacción en milisegundos de las tareas motora (MT) y de seguimiento de reglas (TSR). **a)** en función de *droga*, placebo (barras blancas) y diazepam (barras negras); **b)** en función de *estímulos*, CC = Totalmente Congruente, DI = Dirección Incongruente, CI = Color Incongruente, II = Totalmente Incongruente. Las líneas indican diferencias estadísticas entre condiciones. Los símbolos indican diferencias entre los estímulos de la tarea motora y el estímulo correspondiente de la tarea de seguimiento de reglas. (p 's < 0.05).

5.2.1.1 Diferencias Sexuales

El ANDEVA mixto de tres vías (*sexo x droga x estímulos*) de la tarea de seguimiento de reglas arrojó diferencias estadísticas para los tiempos de reacción en el efecto principal *droga* ($p < 0.008$) resultando tiempos de reacción más lentos con DZ que con PL. En el efecto principal *estímulos* también se observaron diferencias estadísticas ($p < 0.0009$), como puede verse en la Fig. 5.2a. Los tiempos de reacción resultaron menores para el estímulo CC, el totalmente congruente, en comparación con los otros tres estímulos incongruentes (CI, DI, II); los tiempos de reacción de los estímulos CI y DI, en los que tienen que inhibir una respuesta, también fueron mayores que los del estímulo II. No se encontraron diferencias en el efecto principal *sexo* ($p = 0.1$). La interacción entre los factores *droga* y *estímulos* resultó estadísticamente significativa ($p < 0.48$) (Fig. 5.2b). El análisis post-hoc para comparaciones múltiples mostró que los tiempos de reacción con tanto con PL como con DZ son menores para el estímulo totalmente congruente (CC) en comparación con los tres incongruentes (DI, CI e II). Adicionalmente, con DZ los tiempos de reacción del estímulo II (totalmente incongruente) resultaron más rápidos que los tiempos de reacción de los estímulos en los que inhiben una respuesta (DI y CI). Comparando entre PL y DZ el tiempo de reacción bajo el efecto del DZ es mayor en los estímulos: DI, CI e II en comparación a todos los estímulos con PL, mientras que el tiempo de reacción del estímulo CC con DZ es más lento que el presentado en los estímulos en los que dan una doble respuesta (CC e II) en la condición PL.

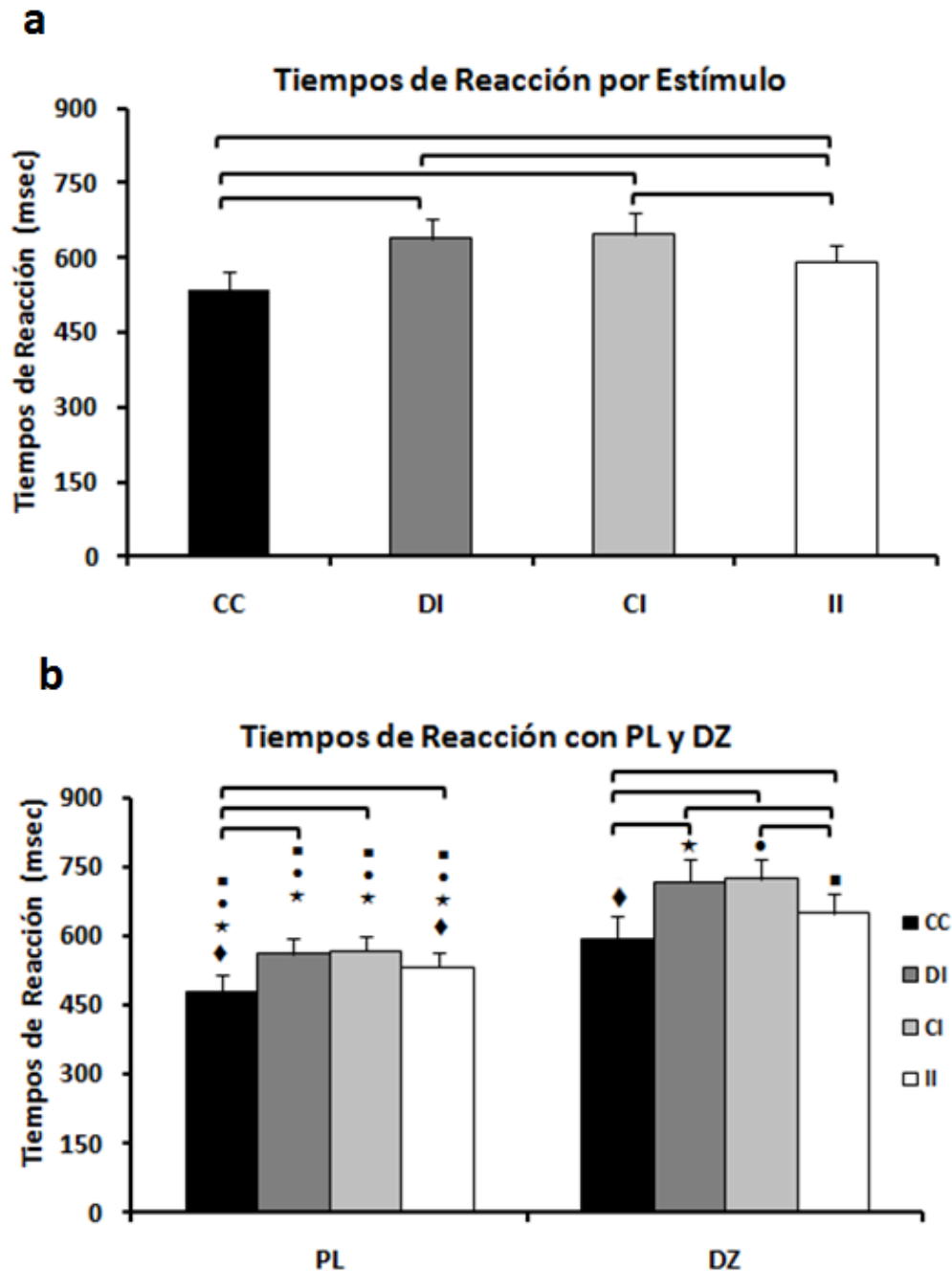


Fig. 5.2 Efectos significativos obtenidos del análisis de los datos conductuales. Medias y errores estándar de los tiempos de reacción en milisegundos de la tarea de seguimiento de reglas. **a)** en función de *estímulos*; **b)** interacción de *droga* y *estímulos*, CC = Totalmente Congruente, DI = Dirección Incongruente, CI = Color Incongruente, II = Totalmente Incongruente. Las líneas indican diferencias estadísticas entre condiciones. Los símbolos indican diferencias entre los estímulos con diazepam (DZ) y placebo (PL). (p 's < 0.05).

5.2.2 Aciertos

Para el porcentaje de aciertos se realizaron los mismos análisis estadísticos que con los tiempos de reacción. El efecto principal de *tarea* fue estadísticamente significativo ($p < 0.0001$) con más respuestas correctas en la tarea motora que en la de seguimiento de reglas (Fig. 5.3a). El efecto principal de *droga* también fue estadísticamente significativo ($p < 0.001$); los sujetos cometieron más errores con DZ que con PL. Al igual que con los tiempos de reacción, se observó una tendencia del efecto principal de *estímulos* ($p = 0.06$), junto con una interacción de *tarea por estímulos* ($p < 0.03$) (Fig. 5.3b). Las comparaciones post-hoc mostraron que se cometieron más errores significativamente ($p < 0.01$) para el ensayo totalmente incongruente comparado con el congruente (II), sólo durante la tarea de seguimiento de reglas. Se observó una interacción significativa ($p < 0.0006$) de *droga por tarea* con más respuestas correctas en la tarea motora que en la de seguimiento de reglas con PL y DZ, sin embargo los efectos del DZ en la tarea de seguimiento de reglas se reflejaron en un mayor número de errores cometidos en comparación con PL.

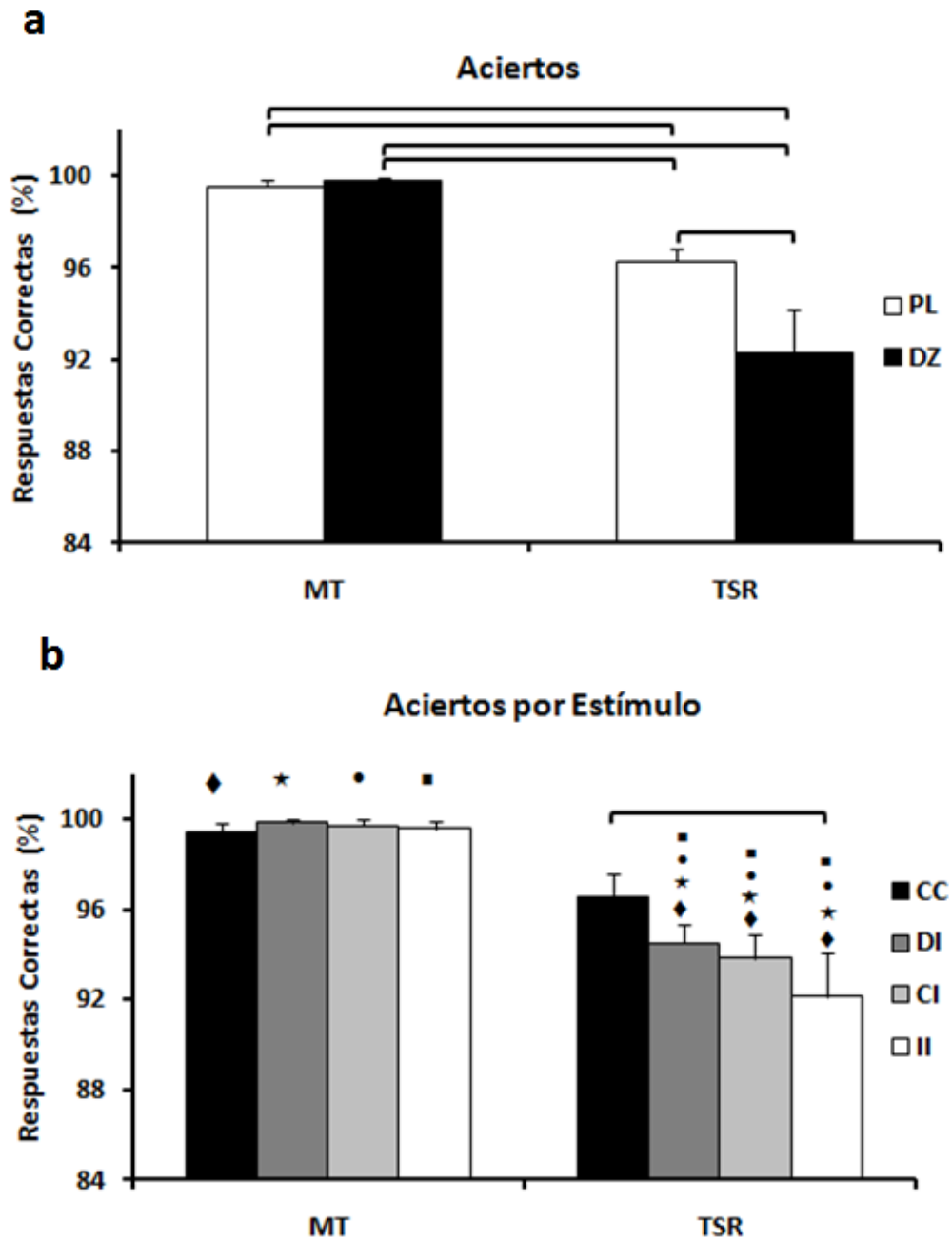


Fig. 5.3 Efectos significativos obtenidos del análisis de los datos conductuales. Medias y errores estándar del porcentaje de aciertos de las tareas motora (MT) y de seguimiento de reglas (TSR) **a)** en función de *droga*, placebo (barras blancas) y diazepam (barras negras); **b)** en función de *estímulos*, CC = Totalmente Congruente, DI = Dirección Incongruente, CI = Color Incongruente, II = Totalmente Incongruente. Las líneas indican diferencias estadísticas entre condiciones. Los símbolos indican diferencias entre los estímulos de la tarea motora y el estímulo correspondiente de la tarea de seguimiento de reglas. ($p < 0.05$).

5.2.2.1 Diferencias Sexuales

En la tarea de seguimiento de reglas se encontró que el efecto principal *droga* arrojó diferencias significativas ($p < 0.03$) resultando mayor el porcentaje de aciertos con PL que con DZ. El efecto principal *estímulos* resultó significativo ($p < 0.01$). Se observó un menor el porcentaje de aciertos para el estímulo totalmente incongruente (II) en comparación con el totalmente congruente (CC); el efecto principal *sexo* no mostró diferencias significativas ($p = 0.2$). La interacción entre los factores *sexo*, *droga* y *estímulos* arrojó diferencias estadísticas ($p < 0.03$). Las pruebas post-hoc para comparaciones múltiples mostraron que el porcentaje de aciertos con DZ fue mayor para los hombres que para las mujeres en las decisiones CC e II, las dos decisiones en las que emiten doble respuesta (Fig. 5.4). Como puede verse en la Fig. 5.5, el porcentaje de aciertos en el grupo de mujeres fue menor con DZ en comparación a PL en las decisiones CC, CI e II, mientras los hombres no presentaron diferencias en este sentido; adicionalmente, el porcentaje de aciertos fue mayor para la decisión IV en comparación con la IR exclusivamente en el grupo de mujeres bajo el efecto del DZ.

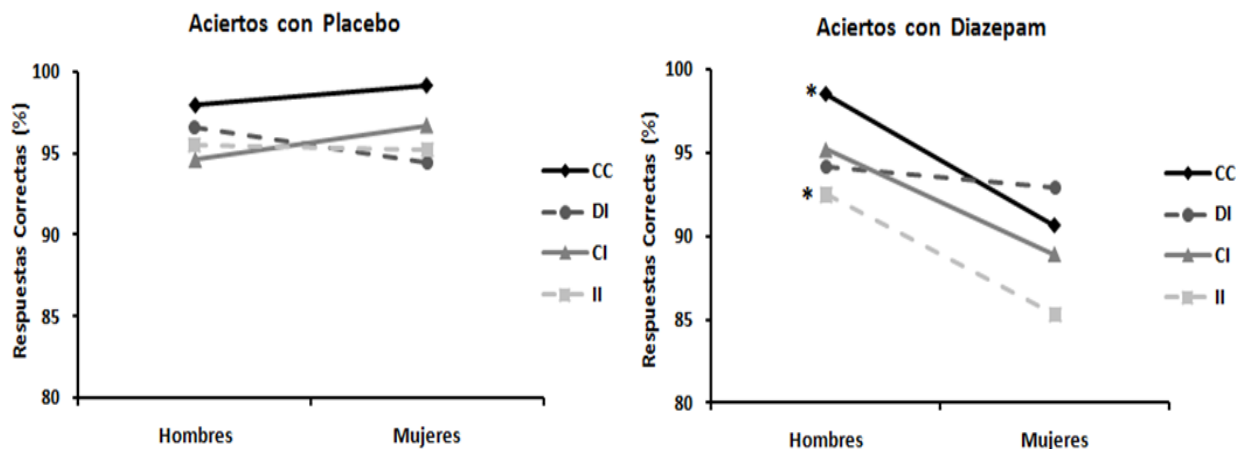


Fig. 5.4 Medias del porcentaje de aciertos de la tarea de seguimiento de reglas para hombres y mujeres de cada *estímulo*, CC = Totalmente Congruente, DI = Dirección Incongruente, CI = Color Incongruente, II = Totalmente Incongruente, con placebo (izquierda) y diazepam (derecha). Los asteriscos junto a los estímulos CC e II de la condición DZ muestran diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre hombres y mujeres.

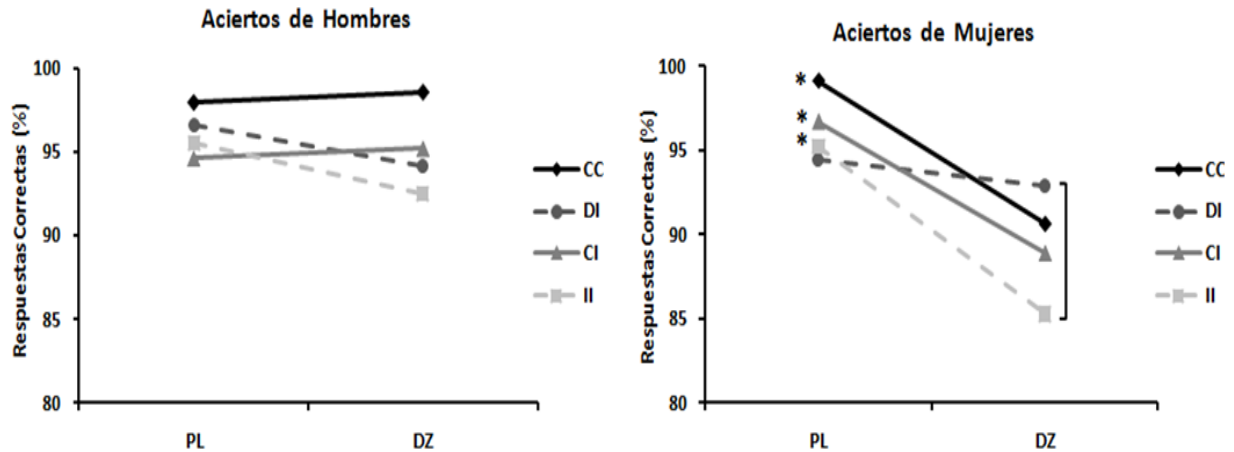


Fig. 5.5 Medias del porcentaje de aciertos de la tarea de seguimiento de reglas con placebo (PL) y diazepam (DZ) de cada estímulo, CC = Totalmente Congruente, DI = Dirección Incongruente, CI = Color Incongruente, II = Totalmente Incongruente, para hombres (izquierda) y mujeres (derecha). Los asteriscos junto a los estímulos CC, DI e II del grupo de mujeres muestran diferencias estadísticas entre PL y DZ; la línea indica diferencias entre los estímulos CC e II en la condición DZ. (p 's < 0.05).

5.3 Resultados de Resonancia Magnética funcional

5.3.1 Tarea de Seguimiento de Reglas Bajo Placebo

En la Fig. 5.6 se muestran las activaciones significativas para el contraste de las cuatro reglas menos los ensayos vacíos bajo PL. La selección de la respuesta de acuerdo al seguimiento de reglas arbitrarias produjo activación del giro frontal medio izquierdo (área de Brodmann (BA) 46); la región anterior del giro del cíngulo derecho (BA 24, 32), la porción superior del lóbulo parietal izquierdo (BA 40), y de manera bilateral el giro lingual (BA 18), la precuña (BA 7 y 19) y el cerebelo. En la Tabla 5.1 se muestran todas las activaciones significativas. Al final de la sección de resultados se encuentran las tablas de los contrastes realizados.

5.3.1.1 Incongruentes vs Congruente

El contraste entre los ensayos incongruentes *versus* el congruente, mostró que la actividad cerebral incrementó con los ensayos incongruentes en la región anterior del giro del cíngulo derecho (BA 32) y el giro frontal medio (BA 9), mientras que no se observaron decrementos significativos asociados con estos estímulos (Fig. 5.7 y Tabla 5.1).

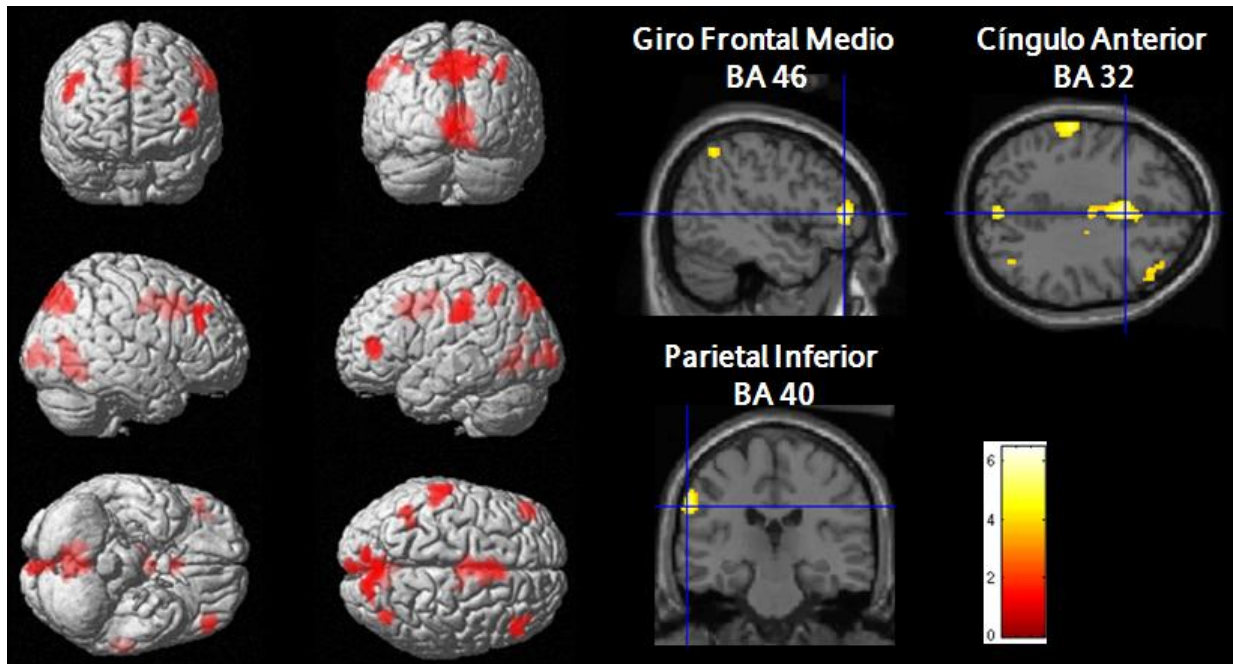


Fig. 5.6 Activaciones del contraste de estímulos vs. ensayos vacíos para la condición placebo en los planos anterior, posterior, laterales, basal y dorsal del cerebro (izquierda); mapas estadísticos de activación que muestran algunas regiones representativas.

5.3.1.2 Doble respuesta vs Inhibición

Comparando la inhibición de una respuesta *versus* la doble respuesta se observó mayor activación en el giro frontal medio (BA 46) derecho. El área que presentó menor activación cuando se trata de inhibir la respuesta en comparación a la doble respuestas fue la región dorsal del giro del cíngulo (BA 31/24) izquierdo (Fig. 5.8 y Tabla 5.1).

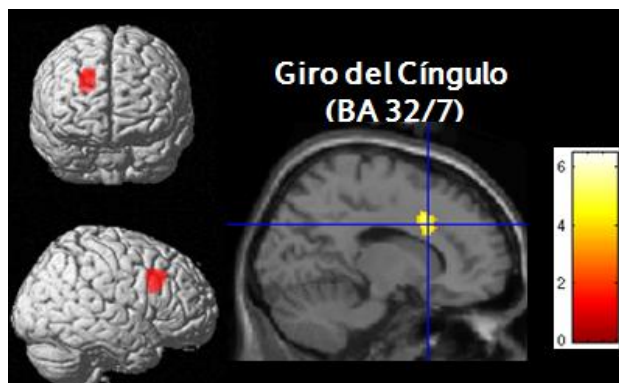


Fig. 5.7 Activaciones del contraste de los estímulos incongruentes vs. el congruente para la condición placebo en los planos anterior y lateral del cerebro (izquierda); mapa estadístico de activación en un corte parasagital (derecha). En la Tabla 5.1 se muestran las características de esta activación.

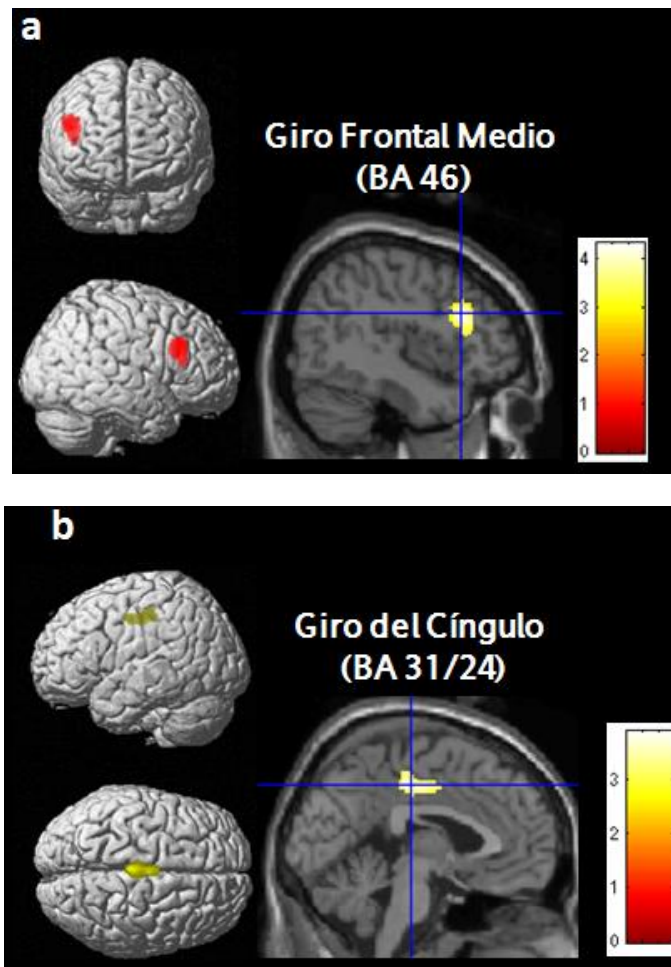


Fig. 5.8 Diferencias estadísticas del contraste inhibición vs doble respuesta para la condición placebo **a)** región con incremento de activación para los estímulos que demandan inhibir una respuesta **b)** reducción de la actividad asociada a la inhibición de la respuesta. En la Tabla 5.1 se muestran las características de este contraste.

5.3.2 Efectos del Diazepam

Se encontraron activaciones significativas asociadas a la selección de respuestas de las cuatro reglas *versus* los ensayos vacíos bajo los efectos de DZ en comparación con PL, en las regiones inferior (BA 40) y superior (BA 7) del lóbulo parietal derecho, la precuña derecha (BA 7), las regiones posteriores del lóbulo temporal derecho como el giro fusiforme y el giro temporal inferior (BA 20) y más rostralmente el giro temporal superior (BA 22 y 38); regiones profundas del lóbulo temporal izquierdo como el giro parahipocámpico (BA 34 y 36), el uncus (BA 28) y el giro temporal medio (BA 37). Otras activaciones se encontraron en la ínsula y el

claustrum izquierdos; el putamen de ambos hemisferios y en los giros medio e inferior del lóbulo occipital derecho (BA 18 y 19) (Fig. 5.9 y Tabla 5.2).

No se encontraron áreas con mayor activación para PL que para DZ con el umbral estadístico establecido. Sin embargo, debido a que el DZ ejerce una influencia inhibitoria en las neuronas se espera una reducción de la actividad metabólica por lo que se llevó a cabo un análisis exploratorio con un umbral estadístico más bajo ($p < 0.01$ no corregido). Se observó una disminución de la actividad con DZ en los giros frontales inferior (BA 9), medio (BA 10) y superior (BA9) del lado derecho, en el giro frontal inferior izquierdo (BA 45), en el giro precentral derecho (BA 6), la ínsula izquierda (BA 13), el giro del cíngulo anterior derecho (BA 24) y de manera bilateral el lóbulo parietal en su porción inferior (BA 40) incluyendo al giro supramarginal (Fig. 5.9 y Tabla 5.3).

5.3.2.1 Incongruentes vs Congruente

La prueba t pareada entre PL y DZ para los ensayos incongruentes versus los congruentes reveló diferencias significativas en la región retrosplenial del lado derecho (BA 30). Los análisis post-hoc de los parámetros estimados para la activación de los *clusters* correspondientes a las diferentes condiciones revelaron que la actividad fue mayor para DZ en comparación con PL durante los ensayos congruentes (Fig. 5.10a y Tabla 5.2).

5.3.2.2 Inhibición vs Doble respuesta

Comparando la inhibición de una respuesta *versus* doble *click* entre PL y DZ se observaron diferencias significativas en el giro frontal medio del hemisferio derecho y en el lóbulo parietal izquierdo abarcando los giros supramarginal y angular. Los análisis post-hoc de los parámetros estimados para la activación de los *clusters* correspondientes a las diferentes condiciones revelaron que la actividad fue mayor para DZ en comparación con PL durante los ensayos en los que había que inhibir una respuesta (Fig. 5.10b y Tabla 5.2).

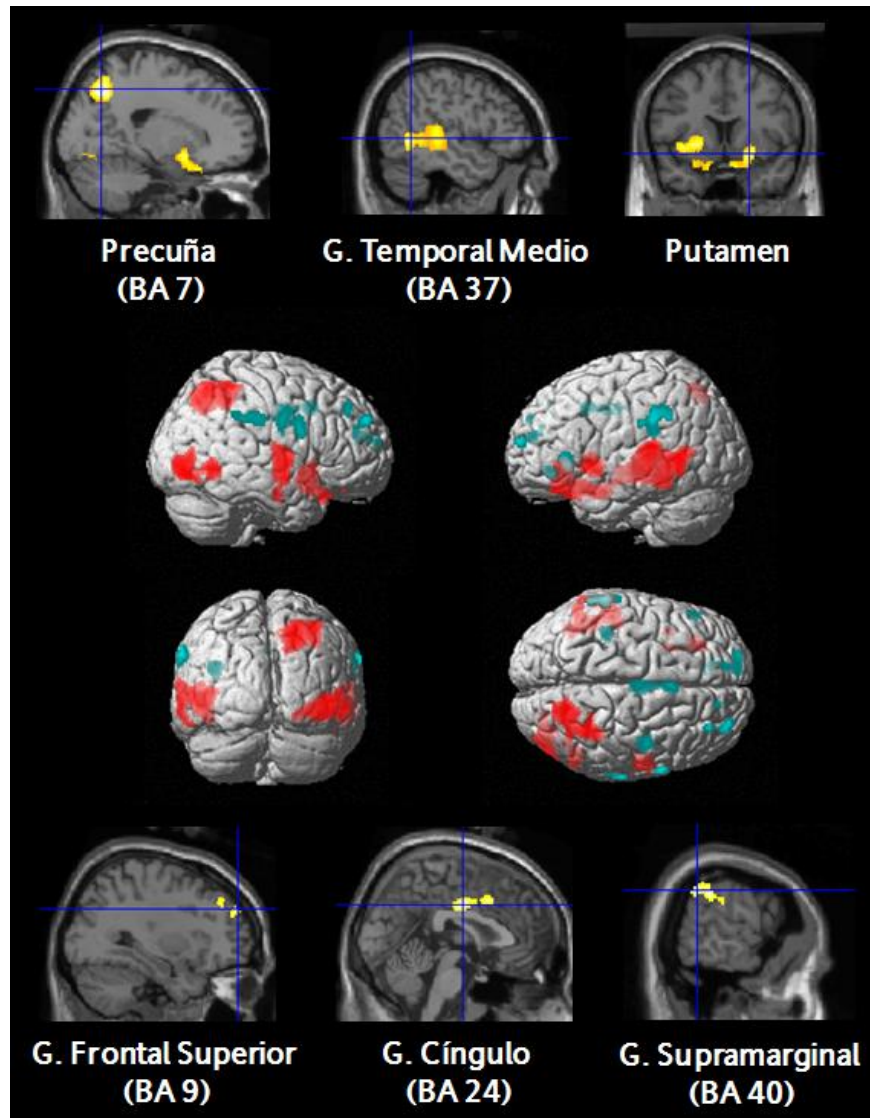


Fig. 5.9 Regiones con diferencias significativas entre diazepam y placebo para el contraste de las cuatro reglas menos los ensayos vacíos. En el centro se muestra en rojo el aumento y en azul la reducción de actividad. Arriba se muestran algunas de las regiones con mayor actividad. Abajo se muestran regiones en las que la actividad se redujo, para este contraste el umbral estadístico fue menor ($p= 0.01$).

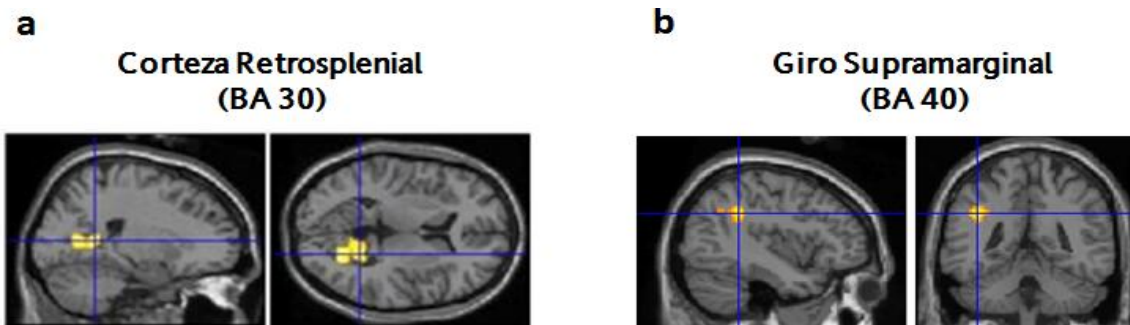


Fig. 5.10 Regiones significativas para la interacción entre droga (DZ/PL) y tipo de estímulo **a)** congruente vs incongruente, **b)** inhibición vs doble respuesta.

5.3.3 Diferencias Sexuales

5.3.3.1 Tarea de Seguimiento de Reglas

La prueba t para muestras independiente entre hombres y mujeres del contraste de las cuatro reglas *versus* los ensayos vacíos con PL reveló diferencias estadísticamente significativas en el giro frontal medio (BA 10) y la región anterior del giro del cíngulo (BA32) del hemisferio derecho. Los análisis post-hoc de los parámetros estimados para la activación de los *clusters* correspondientes a las diferentes condiciones revelaron una menor activación en el grupo de mujeres en comparación con el grupo de hombres (Fig. 5.11a y Tabla 5.4). El mismo análisis anterior para la condición DZ reveló menor activación en las mujeres en comparación con los hombres en el giro frontal superior derecho (BA 9/10), los giros frontales medio (BA 10 y 46) e inferior (BA 44 y 45) izquierdos, la región anterior del giro del cíngulo (BA 25) derecho, la precuña bilateral (BA 7 y 19); del lado izquierdo la cuña (BA 19), el uncus (BA 20) y el cerebelo y el núcleo caudado derecho (Fig. 5.11b y Tabla 5.4).

5.3.3.2 Incongruentes vs Congruente

La comparación entre la congruencia de los estímulos con PL arrojó diferencias significativas con mayor actividad en las mujeres que en los hombres en el hemisferio derecho en el giro frontal superior (BA 10), la ínsula (BA 13), la región inferior del lóbulo parietal (BA 39) y el putamen; y el giro precentral de manera bilateral (BA 6) (Fig. 5.12a y Tabla 5.4). Con DZ no se observaron activaciones estadísticamente significativas con el umbral establecido.

5.3.3.3 Inhibición vs Doble respuesta

La prueba t para muestras independiente entre hombres y mujeres del contraste doble *versus* un click con PL reveló diferencias estadísticamente significativas en el hemisferio derecho en el giro frontal superior (BA 10), del núcleo lentiforme en el putamen y el globo pálido lateral y en el tálamo; en el hemisferio izquierdo se observaron diferencias en el giro frontal inferior (BA 47), los giros pre (BA 6) y postcentral (BA 2), el giro fusiforme (BA 20), el polo temporal (BA 38), el giro parahipocámpico y el giro occipital superior abarcando la cuña (BA 19); al igual que en los contrastes anteriores, la actividad fue menor en el grupo de mujeres

que en el de hombres (Fig. 5.12b y Tabla 5.4). Bajo el efecto del DZ no se encontraron activaciones estadísticamente significativas con el umbral establecido.

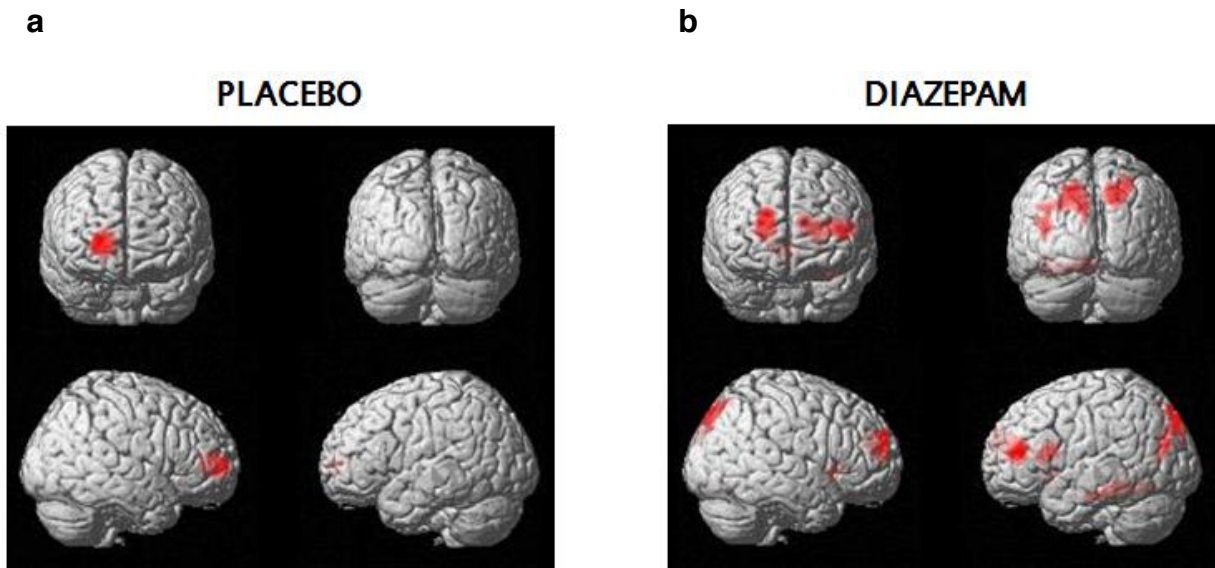


Fig. 5.11 Activaciones con diferencias estadísticas entre hombres y mujeres para el contraste de estímulos vs. ensayos vacíos en los planos anterior, posterior y laterales del cerebro **a)** para la condición placebo **b)** para la condición diazepam.

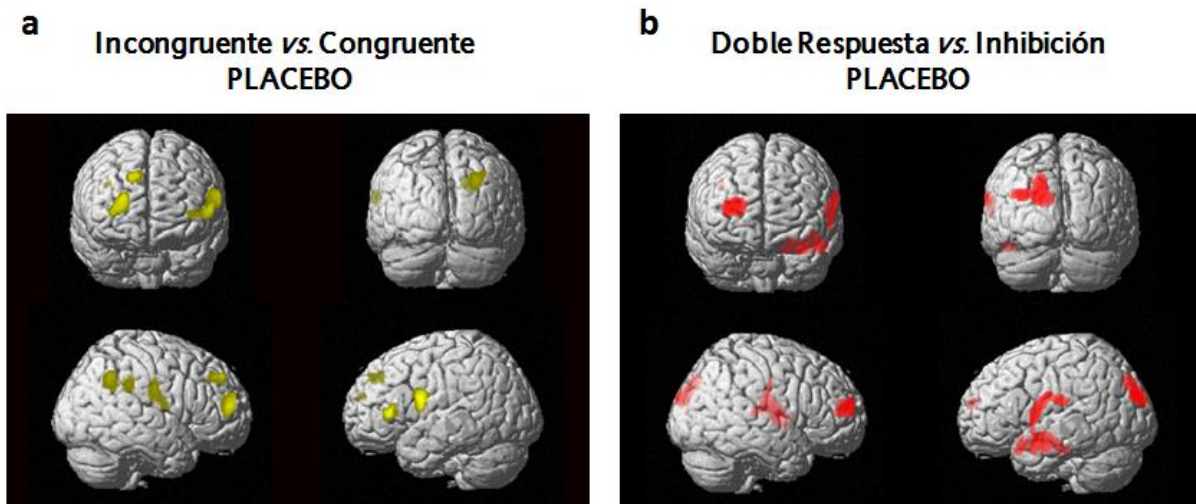


Fig. 5.12 Activaciones con diferencias estadísticas entre hombres y mujeres para la condición placebo en los planos anterior, posterior y laterales del cerebro **a)** para el contraste incongruente versus congruente en el que la actividad es menor en hombres que en mujeres y **b)** para el contraste doble respuesta versus inhibición con mayor actividad en hombres que en mujeres.

Tabla 5.1 Regiones con actividad BOLD significativa en la condición placebo para los siguientes contrastes: selección de respuesta menos no-respuesta, congruente *versus* incongruente e inhibición *versus* doble respuesta.

Puntaje Z Voxel	Coordenadas			Regiones activas	Área Brodmann	Tamaño Cluster
	x	y	z			
<i>Respuesta > No-Respuesta</i>						
4.54	-46	40	6	I	Giro Frontal Medio	170
4.53	6	-68	0	D	Giro Lingual	1014
4.28	0	-58	-6	I	Cerebelo	
3.76	14	-58	-16	D	Cerebelo	-
4.25	0	-76	56	I	Precuña	661
4.18	2	-78	40	D	Precuña	
3.92	-10	-84	42	I	Precuña	BA 19
4.16	-62	-24	32	I	Lóbulo Parietal Inferior	BA 40
4.15	2	14	36	D	Giro del Cíngulo	BA 32
4.05	-6	-4	52	I	Giro Frontal Medial	BA 6
3.53	2	-10	40	D	Giro del Cíngulo	BA 24
3.86	-2	-98	-4	I	Giro Lingual	BA 18
<i>Incongruente > Congruente</i>						
4.52	20	16	36	D	Cingulate/Middle Frontal	BA 32/ 9
<i>Congruent > Incongruente</i>						
-	-	-	-		-	-
<i>Inhibición > Doble Respuesta</i>						
3.51	44	22	26	D	Giro Frontal Medio	BA 46
<i>Doble Respuesta > Inhibición</i>						
3.25	-4	-22	44	I	Giro del Cíngulo	BA 31
2.92	-2	-6	42	I	Giro del Cíngulo	BA 24

D = Hemisferio Derecho, I = Hemisferio Izquierdo, BA = Área de Brodmann

Tabla 5.2 Regiones con diferencias en la actividad BOLD entre diazepam y placebo durante la selección de respuesta menos no-respuesta, congruente versus incongruente e inhibición versus doble respuesta.

Puntaje Z Voxel	Coordenadas			Regiones activas	Área Brodmann	Tamaño Cluster
	x	y	z			
<i>Respuesta > No-Respuesta DZ > PL</i>						
3.84	20	-66	48	D Precuña	BA 7	923
3.46	34	-46	58	D Lóbulo Parietal Superior		
3.15	34	-52	46	D Lóbulo Parietal Inferior	BA 40	
3.69	-48	-54	0	I Giro Temporal Medio	BA 37	1404
3.36	-42	-32	-6	I Giro Parahipocámpico	BA 36	
3.65	24	10	-10	D Putamen	-	433
3.04	10	10	-22	D Giro Recto	BA 11	
2.98	30	22	-28	D Giro Temporal Superior	BA 38	
3.61	-36	6	-4	I Claustrum/Ínsula	-	
3.41	-24	10	-2	I Putamen	-	367
3.44	-16	4	-26	I Uncus	BA 28	823
3.27	-10	-2	-18	I Giro Parahipocámpico	BA 34	
3.21	46	-78	-6	D Giro Occipital Inferior	BA 19	615
3.14	30	-80	-8	D Giro Occipital Medio	BA 18	
2.98	40	-84	-2	D Giro Occipital Inferior		
2.98	54	-10	-8	D Giro Temporal Superior	BA 22	398
2.58	46	-14	-24	D Giro Fusiforme	BA 20	
2.47	52	-10	-20	D Giro Temporal Inferior		
<i>Incongruente > Congruente</i>						
-	-	-	-	-	-	-
<i>Congruente > Incongruente</i>						
4.71	28	-66	10	D Corteza Retrosplenial	BA 30	507
<i>Inhibición > Doble Respuesta PL > DZ</i>						
-	-	-	-	-	-	-
<i>Doble Respuesta > Inhibición</i>						
4.53	48	18	22	D Giro Frontal Medio	BA 46	903
3.39	52	32	32	D Giro Frontal Medio	BA 9	
3.77	-40	-44	32	I Giro Supramarginal	BA 40	228
2.93	-38	-60	36	I Giro Angular	BA 39	

D = Hemisferio Derecho, I = Hemisferio Izquierdo, BA = Área de Brodmann

Tabla 5.3 Regiones que muestran una reducción de la actividad BOLD con diazepam en comparación con placebo durante la selección de respuesta menos no-respuesta. Para este contraste el umbral se bajó como análisis exploratorio ($p < 0.01$).

Puntaje Z Voxel	Coordenadas			Regiones activas	Área Brodmann	Tamaño Cluster
	x	y	z			
<i>Respuesta > No-Respuesta PL > DZ</i>						
2.67	-62	-46	36	I Giro Supramarginal	BA 40	123
2.62	-62	-36	34	I Lóbulo Parietal Inferior		
2.66	64	6	24	D Giro Frontal Inferior	BA 9	37
2.62	2	-10	36	D Giro del Cíngulo	BA 24	219
2.5	-52	30	2	I Giro Frontal Inferior	BA 45	49
2.46	-38	-34	24	I Ínsula	BA 13	84
2.44	68	-26	32	D Lóbulo Parietal Inferior	BA 40	46
2.38	32	54	32	D Giro Frontal Superior	BA 9	49
2.32	44	-8	30	D Giro Precentral	BA 6	132
2.25	-10	38	-8	I Giro Frontal Medio	BA 10	38

D = Hemisferio Derecho, I = Hemisferio Izquierdo, BA = Área de Brodmann

Tabla 5.4 Regiones que muestran diferencias de la actividad BOLD entre hombres y mujeres con placebo y con diazepam durante la selección de respuesta menos no-respuesta.

Puntaje Z Voxel	Coordenadas			Regiones activas	Área Brodmann	Tamaño Cluster
	x	y	z			
<i>Respuesta > No-Respuesta Hombres > Mujeres</i>						
PLACEBO						
3.58	14	44	8	D	Giro del Cíngulo	552
3.45	22	56	2	D	Giro Frontal Superior	
DIAZEPAM						
4.36	16	-88	44	D	Precuña	316
3.79	24	-82	52	D	Precuña	
4.1	-18	-28	-18	L	Cerebelo	869
4.01	-34	-16	-24	L	Uncus	
3.79	-48	42	14	L	Giro Frontal Medio	894
3.64	-38	40	16	L	Giro Frontal Medio	
3.55	-14	42	20	L	Giro Frontal Medio	
3.69	-16	-84	44	L	Precuña	624
3.4	-38	-76	18	L	Giro Temporal Medio	
3.29	-8	-90	32	L	Cuña	
3.51	18	58	20	D	Giro Frontal Superior	537
3.1	16	50	26	D	Giro Frontal Superior	
3.37	-44	20	14	L	Giro Frontal Inferior	222
3.03	-50	12	14	L	Giro Frontal Inferior	
3.34	2	14	-2	D	Giro del Cíngulo	334
3.15	14	22	0	D	Caudado	
<i>Respuesta > No-Respuesta Mujeres > Hombres</i>						
PLACEBO						
-	-	-	-		-	-
DIAZEPAM						
-	-	-	-		-	-

D = Hemisferio Derecho, I = Hemisferio Izquierdo, BA = Área de Brodmann

Tabla 5.5 Regiones que muestran diferencias de la actividad BOLD entre hombres y mujeres con placebo y con diazepam en el contraste congruente versus incongruente.

Puntaje Z Voxel	Coordenadas			Regiones activas	Área Brodmann	Tamaño Cluster
	x	y	z			
<i>Incongruente > Congruente Hombres > Mujeres</i>						
PLACEBO						
-	-	-	-	-	-	-
DIAZEPAM						
-	-	-	-	-	-	-
<i>Incongruente > Congruente Mujeres > Hombres</i>						
PLACEBO						
3.94	28	-56	36	D	Lóbulo Parietal Superior	204
3.67	-56	2	22	I	Giro Precentral	179
3.54	36	-14	30	D	Giro Precentral	183
3.07	34	-8	16	D	Ínsula	
2.72	26	-8	14	D	Putamen	
3.45	22	50	18	D	Giro Frontal Superior	233
DIAZEPAM						
-	-	-	-	-	-	-

D = Hemisferio Derecho, I = Hemisferio Izquierdo, BA = Área de Brodmann

Tabla 5.6 Regiones que muestran diferencias de la actividad BOLD entre hombres y mujeres con placebo y con diazepam en el contraste inhibición versus doble respuesta.

Puntaje Z Voxel	Coordenadas			Regiones activas	Área Brodmann	Tamaño Cluster
	x	y	z			
<i>Doble Respuesta > Inhibición Hombres > Mujeres</i>						
PLACEBO						
4.15	-18	-84	36	I	Cuña	488
3.94	-18	-90	28	I	Cuña	
3.46	-34	-90	26	I	Giro Occipital Superior	
3.58	-20	-6	-18	I	Giro Parahipocámpico	247
3.01	-34	14	-20	I	Giro Temporal Superior	
3.01	-26	10	-18	I	Giro Frontal Inferior	
3.57	-46	-8	-16	I	Giro Temporal Inferior	341
3.38	-46	0	-14	I	Giro Temporal Superior	
2.98	-40	-28	-24	I	Giro Fusiforme	
3.56	24	-10	14	D	Putamen	564
3.17	10	-8	0	D	Tálamo	
3.08	14	-2	4	D	Globo Pálido Lateral	
3.55	24	56	16	D	Giro Frontal Superior	377
3.53	-64	-4	22	I	Giro Precentral	213
3.52	-62	2	10	I	Giro Precentral	
3.19	-66	-20	22	I	Giro Precentral	
DIAZEPAM						
-	-	-	-		-	-
<i>Doble Respuesta > Inhibición Mujeres > Hombres</i>						
PLACEBO						
-	-	-	-		-	-
DIAZEPAM						
-	-	-	-		-	-

D = Hemisferio Derecho, I = Hemisferio Izquierdo, BA = Área de Brodmann

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se investigaron los efectos conductuales y neurales de la implementación de reglas complejas en voluntarios saludables bajo el efecto de una dosis de diazepam; y se compararon las diferencias entre hombres y mujeres, tanto en la ejecución como en la actividad cerebral mediante la técnica de resonancia magnética funcional.

6.1 Ejecución

Los tiempos de reacción mostraron que una dosis de 10 mg de DZ deterioró la ejecución en una tarea guiada por reglas, lentificando la selección de la respuesta pertinente de acuerdo a reglas complejas. De igual manera, la ejecución se afectó con esta dosis, lo cual es congruente con datos previos (Cunha et al. 2006; Boucart et al. 2007). El efecto en los tiempos de reacción no se debe a una alteración por el DZ sobre las funciones motoras ya que en la tarea para controlar el componente motor de la respuesta, la cual contiene los mismos estímulos que la tarea de seguimiento de reglas, no se observaron diferencias entre placebo y diazepam. En la mayoría de los estudios dirigidos a medir la motricidad se encuentra un aumento en los tiempos de reacción por el DZ (Masson et al. 2000; Mintzer et al. 2001). Sin embargo, estos resultados no siempre se replican (Hindmarch et al. 2005) lo cual puede deberse a qué tan predecible es el momento en el que se debe responder y la duración del tiempo de preparación de la respuesta.

Aunque los tiempos de reacción fueron más largos para la primera sesión que para la segunda, no se observaron interacciones con la droga, sugiriendo que el efecto del DZ en esta tarea no está mediado por un deterioro en el aprendizaje o en procesos de memoria a largo plazo.

6.2 Correlatos neurales

La tarea de implementación de reglas bajo PL activó regiones de asociación incluyendo el giro frontal medio y las regiones dorsales del giro del cíngulo, así como las áreas de asociación de la corteza parietal. La activación de estas regiones es consistente con estudios previos que muestran que la demanda de funciones cognoscitivas complejas, como la conducta guiada por reglas, involucran la participación de áreas prefrontales dorsolaterales (Toni et al. 2001; Johnson et al. 2003; Christoff et al. 2009), el giro del cíngulo anterior involucrado en situaciones de conflicto y el monitoreo de la ejecución (Botvinick 2007) y el lóbulo parietal implicado en

procesos de atención (Petersen et al. 1994; Corbetta & Shulman 2002). También se observaron activaciones en regiones posteriores como en la corteza parietal superior derecha que se extienden hasta la precuña, así como regiones visuales, consistente con la naturaleza visuoespacial de los estímulos utilizados (Botvinick 2007); y el cerebelo, posiblemente relacionado con los componentes motores y los componentes de asociación de la tarea (Bellebaum & Daum 2009).

Con placebo, se observaron más activas la región anterior del giro del cíngulo y el giro medio del lóbulo frontal durante los ensayos *incongruentes* que durante los *congruentes*, de acuerdo con estudios previos en los que muestran que las funciones cognoscitivas de alto nivel, involucran la participación de la región dorsolateral de los lóbulos frontales (Toni et al. 2001; Johnson et al. 2003; Christoff et al. 2009) y la región anterior del giro del cíngulo, relacionada con el monitoreo de la información y con el conflicto entre las diferentes propiedades sensoriales de los estímulos (Botvinick 2007). Estas áreas aparecen en el hemisferio derecho, el cual se ha asociado con el procesamiento de situaciones cognoscitivas novedosas (Goldberg et al. 1994).

Consistentemente con otros resultados que exploran la inhibición de respuestas (Kawashima et al. 1996; Buchsbaum et al. 2005; Garavan et al. 2006; Picton et al. 2007), se encontró mayor activación en áreas frontales (BA 46) del hemisferio derecho en condiciones normales (bajo PL). Esto sugiere que el proceso desplegado al inhibir la respuesta motora requiere de la participación de regiones prefrontales de alto orden para que sea ejecutada la respuesta de inhibición. Al emitir una doble respuesta, en comparación con la inhibición, se encontró un aumento de actividad en la región dorsal del giro del cíngulo, área cortical que contiene neuronas relacionadas con el monitoreo de los eventos sensoriales y la conducta del propio organismo (Vogt et al. 1992).

Contrariamente a lo esperado con una sustancia inhibidora, no se observaron disminuciones significativas en la actividad cerebral bajo DZ, comparado con PL. Con DZ se reclutaron nuevas regiones, sugiriendo la expresión de un posible mecanismo de compensación para ejecutar la tarea de seguimiento de reglas adecuadamente. Esta nueva red incluyó diversas regiones del lóbulo temporal, como el giro parahipocámpico, tradicionalmente asociado con procesos de memoria (Bussey et al. 2001). El efecto desfavorable de las BZDs en las tareas de memoria ha sido bien establecido (Ghoneim & Mewaldt 1990; Coull 1999; Mintzer & Griffiths

1999; Rich et al. 2006; Pompéia et al. 2007). Debido a que estas áreas no se encontraron significativamente activas con PL, sugiere que se requirieron procesos adicionales relacionados con la memoria para ejecutar la tarea bajo DZ. Aunque la tarea de seguimiento de reglas utilizada aquí no se considera una tarea de memoria a largo plazo, ya que fue practicada antes de cada sesión de RMf, los sujetos tenían que mantener en su memoria las reglas arbitrarias con el objetivo de responder correctamente durante la ejecución de la tarea. La región posterior del lóbulo temporal izquierdo también mostró mayor actividad con DZ. Esta es una región de asociación polimodal que recibe información de la región inferior del lóbulo temporal, está conectada recíprocamente con el prefrontal (Petrides & Pandya 2002), y se ha visto implicada en el almacenamiento del significado de las reglas (Bunge 2004; Donohue et al. 2005) incrementando su actividad cuando hay claves que señalan la instrucción a seguir asociadas con reglas específicas (Bunge et al. 2003). También se encontraron activaciones significativas en áreas importantes para desempeñar procesos cognoscitivos de alto orden como la unión temporo-parietal (Corbetta & Shulman 2002), la ínsula y el claustrum (Huettel & McCarthy 2004) y la región superior del lóbulo parietal (Petersen et al. 1994; Corbetta & Shulman 2002). Finalmente, se observó un área de activación más extensa en regiones involucradas en el procesamiento de las propiedades visuales de los estímulos.

Bajo DZ en comparación con PL para los estímulos *congruentes* se observó un incremento de actividad en la corteza retrosplenial del hemisferio derecho, probablemente relacionada con la recuperación de la información almacenada a largo plazo (Krause et al. 1999). En contraste, los estímulos que requerían la *inhibición* de la respuesta con DZ se observó una reducción de actividad en el giro frontal medio del hemisferio derecho y en el lóbulo parietal izquierdo. Este efecto del DZ sobre regiones que son necesarias para la inhibición de respuestas (frontal derecho) y de asociación intermodal (giros angular y supramarginal parietales) pudiera explicar los tiempos de reacción más lentos observados en estos estímulos en comparación a los estímulos en los que se emite un *doble click*.

Como consecuencia de la actividad inhibidora del DZ se esperaba una reducción en la actividad metabólica, que no se observó hasta que se redujo substancialmente el umbral de probabilidad ($p < 0.01$). Sin embargo, la falta de deactivación se ha observado en otros estudios con PET (Mintzer et al. 2001), sugiriendo que las demandas cognoscitivas de la tarea serían

suficientes para revertir la reducción de la actividad reportada en reposo con BZDs (Veselis et al. 1997; Reinsel et al. 2000).

Con la administración de DZ es posible que a nivel celular las interneuronas GABAérgicas estén inhibidas, interrumpiendo la inhibición de áreas que regularmente están silentes, y que bajo DZ se activan, interfiriendo con el procesamiento adecuado de la información. El incremento metabólico observado es consistente con el incremento reportado con BZDs en el lóbulo temporal en reposo (Volkow et al. 1995; Wang et al. 1999), apoyando la evidencia de que el DZ afecta selectivamente la actividad cerebral de ciertas regiones más que impactar de manera global al cerebro.

6.3 Diferencias sexuales

Al analizar la precisión en la ejecución de la tarea de seguimiento de reglas se encontró que el porcentaje de aciertos con DZ fue menor para las mujeres en comparación con los hombres en los estímulos que tenían que dar una doble respuesta, el totalmente congruente y el totalmente incongruente. Adicionalmente, al comparar entre las condiciones placebo y diazepam las mujeres cometieron más errores en las condiciones donde tenían que inhibir una de las respuestas y en la condición totalmente congruente bajo diazepam en comparación con placebo. Estos datos concuerdan con el mayor deterioro observado en las mujeres que en los hombres en tareas que demandan atención bajo el efecto de las BZDs (Jackson et al. 2005; Muñoz-Torres 2005; Muñoz-Torres et al. 2011). Los tiempos de reacción de la tarea de seguimiento de reglas no mostraron diferencias significativas entre hombres y mujeres en ninguna de las dos condiciones (PL/DZ), lo que sugiere dos redes cerebrales diferentes modulando la precisión y la rapidez con la que se responde, la cual está relacionada con un fenómeno a nivel central y no periférico, y que resultó igualmente afectado en hombres y mujeres.

Comparando la función cerebral entre hombres y mujeres durante la implementación de reglas bajo placebo se encontró que las mujeres tuvieron menor activación que los hombres en áreas relacionadas con procesos cognoscitivos complejos y atención, la región prefrontal y el giro del cíngulo anterior, respectivamente. Esta menor activación presentada en las mujeres puede deberse a una diferencia en la estrategia para ejecutar la tarea ya que con placebo desempeñan la tarea con la misma precisión y velocidad que los hombres.

Desempeñando la tarea bajo el efecto del diazepam la menor activación vista en el grupo de las mujeres se amplificó, abarcando más regiones de la corteza prefrontal tanto del lado derecho como del izquierdo y también en regiones importantes para el procesamiento de estímulos visuales; la memoria y el aprendizaje del procedimiento de una regla (Toni et al. 2001; Christoff et al. 2009) como el uncus y el núcleo caudado y el cerebelo que se ha implicado en la coordinación del movimiento, aunque también en los componentes asociativos de las tareas (Bellebaum & Daum 2009). La notable reducción en la actividad cerebral que presentan las mujeres bajo el efecto del DZ sobretodo en áreas prefrontales va de acuerdo con la hipótesis planteada, la inhibición de esta región central probablemente explica el detrimento visto en la ejecución, el cuál fue más notorio en las mujeres que en los hombres.

Al descomponer la tarea de acuerdo al tipo de estímulos se observó que con placebo, tanto para los estímulos *incongruentes* en comparación con los *congruentes* como para los estímulos de *inhibición* de una respuesta en comparación a los estímulos de *doble* respuesta las mujeres presentaron menor activación en el giro frontal superior y en el putamen del hemisferio derecho en comparación a los hombres. Para los estímulos *incongruentes* los hombres en comparación a las mujeres reclutaron áreas importantes para desempeñar procesos cognoscitivos de alto orden como el lóbulo parietal (Corbetta & Shulman 2002), y la ínsula (Huettel & McCarthy 2004), mientras que ante los estímulos de *inhibición* de una respuesta se encontró mayor activación en hombres en comparación con mujeres, en regiones asociadas con la memoria como el giro parahipocámpico y giro temporal inferior (Bussey et al. 2001; Poldrack et al. 2001); del núcleo lenticular, adicionalmente al putamen, se activó el globo pálido lateral, relacionado con procesos de inhibición y aprendizaje de una regla (Thorn et al. 2010), el tálamo y regiones occipitales que codifican la información visual. Bajo el efecto del diazepam no se observaron diferencias de activación cerebral entre hombres y mujeres al analizar la tarea de acuerdo a los tipos de estímulos. Lo que sugiere un cambio de activación en las redes funcionales que están homogenizando la función cerebral para todos los estímulos sin presentar las diferencias críticas que existen entre hombres y mujeres en condiciones normales.

En general, los efectos adversos del diazepam tanto a nivel conductual como de funcionamiento cerebral fueron más acentuados en las mujeres que en los hombres.

Las diferencias sexuales observadas en la presente investigación no son atribuibles al efecto activador oscilatorio de las hormonas ya que las mediciones se hicieron al inicio de la fase folicular, cuando los niveles hormonales están más bajos. Estas diferencias entre hombres y mujeres pueden deberse a una organización dimórfica cerebral originada en el periodo crítico de diferenciación sexual por acción de las hormonas sexuales o por la influencia de los genes sexuales. Los datos encontrados con placebo apoyan la teoría que atribuye las diferencias sexuales a la influencia genética, ya que plantea que la preservación de estas diferencias es sustentada en una ventaja evolutiva, es decir, hombres y mujeres desarrollan un desempeño óptimo de las actividades (cognoscitivas), pero a partir de mecanismos cerebrales diferentes ya que están inmersos en medios hormonales y genéticos diferentes.

En este estudio se puede advertir la importancia de analizar los datos de hombres y mujeres por separado ya que algunos efectos encontrados en uno de los grupos quedan atenuados cuando se hace el análisis de todo el grupo junto, como la disminución en regiones frontales observada con el diazepam en las mujeres; o no están presentes en los dos grupos, como el incremento de activación en regiones temporales que sólo se observó en el grupo de hombres.

6.4 Limitaciones

Una de las limitaciones técnicas del presente estudio que debe ser considerada es el número de rebanadas de RMf adquiridas. Sin embargo, aunque sólo son 8 rebanadas, nos aseguramos que quedarán incluidas regiones corticales y subcorticales que fueran importantes para el desempeño de la tarea.

La técnica de RMf se caracteriza por dar información con un retraso en el tiempo, es decir, la resolución temporal de esta técnica no es tan efectiva como la ofrecida con técnicas como la electroencefalografía y la magnetoencefalografía. Sin embargo, la RMf nos permite acceder a la activación cerebral tanto de estructuras corticales como subcorticales con una buena resolución espacial. Al igual que otras técnicas para el estudio de la función cerebral, con RMf no es posible distinguir entre sinapsis excitadoras e inhibitoras, aunque se han hecho esfuerzos por distinguir la participación de los sistemas GABAérgico y glutamatérgico en la actividad BOLD (Buzsáki et al. 2007) aún son necesarios estudios que identifiquen la relación de las bases fisiológicas de los diferentes tipos de sinapsis y la señal BOLD.

El número de participantes es relativamente reducido, no obstante una de las principales ventajas en el diseño experimental es que se miden los mismos sujetos en las condiciones placebo y diazepam y no de dos grupos diferentes lo que incrementa la validez interna.

6.5 Experimentos Futuros

Esta investigación deja preguntas abiertas para analizarse en futuras investigaciones. Desde el punto de vista farmacológico se pueden explorar los efectos del DZ con dosis diferentes y conocer cuál es el punto en el que se dejan de observar activaciones para ser substituidas por inhibiciones, así como para reconocer si en los hombres ocurriría una inhibición de regiones prefrontales a dosis mayores. Por otro lado, se han documentado los cambios fisiológicos que ocurren con patologías como trastornos de ansiedad o tras un consumo crónico de benzodiacepinas, sería importante explorar en poblaciones clínicas el efecto del diazepam en funciones complejas y su correlato neural.

Se requiere de estudios futuros para averiguar el proceso cognoscitivo específico que se ve afectado por drogas GABAérgicas, así como discernir la estrategia cognoscitiva empleada por los sujetos durante la implementación de la regla, cuando están involucradas instrucciones complejas.

Un aspecto que es importante dilucidar es la probable participación de las hormonas sexuales como la progesterona ya que se ha documentado la interacción que tiene con el receptor GABA_A. Así como tratar de averiguar el vínculo que puede existir con diferentes genes como los sexuales para identificar cuál es el origen de las diferencias observadas entre hombres y mujeres.

7. CONCLUSIÓN

Los presentes hallazgos indican que una sola dosis de diazepam deteriora la conducta y la actividad neural, resultando en un impacto negativo en la habilidad para seleccionar la respuesta basada en reglas complejas, especialmente cuando la información es novedosa y va en contra al comportamiento habitual.

Las mujeres son más sensibles que los hombres a la misma dosis de diazepam y muestran un mayor número de errores acompañados de una disminución en la actividad metabólica de regiones corticales involucradas en el procesamiento de información compleja. Los hombres reclutan un mayor número de áreas bajo los efectos del diazepam en comparación con las mujeres y con la condición placebo lo que puede indicar un mecanismo de compensación.

Tomando en conjunto estas observaciones contribuyen a la noción de que la influencia de las benzodiazepinas va más allá de los efectos sedantes y motores ampliamente reportados, y que tienen un efecto adverso en tareas complejas que requieren la selección de respuestas rápidas, particularmente cuando estas demandan la integración de diferentes fuentes de información necesaria para implementar reglas arbitrarias con el objeto de determinar la respuesta más apropiada.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abadie P, Baron J, Bisserbe J, Boulenger J, Rioux P, Travère J, Barré L, Petit-Taboué M, Zarifian E (1992) Central benzodiazepine receptors in human brain: estimation of regional Bmax and KD values with positron emission tomography. *European Journal of Pharmacology* 213:107-115
- Abadie P, Rioux P, Baron J-claude (1996) Central benzodiazepine receptor occupancy by zolpidem in the human brain as assessed by positron emission tomography. *European Journal of Pharmacology* 295:35-44
- Abi-Dargham A, Laruelle M, Seibyl J, Rattner Z, Baldwin RM, Zoghbi SS, Zea-Ponce Y, Bremner JD, Hyde TM, Charney, DS, Hoffer PB, Innis RB (1994) SPECT measurement of benzodiazepine receptors in human brain with iodine-123-iomazenil: kinetic and equilibrium paradigms. *Journal of Nuclear Medicine* 35:228-238
- Akesson TR, Micevych PE (1995) Sex steroid regulation of tachykinin peptides in neuronal circuitry mediating reproductive functions. En: Hammer PE, Micevych RPJr eds. *Neurobiological Effects of Sex Steroid Hormones*. New York: Cambridge University Press, pp.468
- Allredge BK, Gelb a M, Isaacs SM, Corry MD, Allen F, Ulrich S, Gottwald MD, O'Neil N, Neuhaus JM, Segal MR, Lowenstein DH (2001) A comparison of lorazepam, diazepam, and placebo for the treatment of out-of-hospital status epilepticus. *The New England journal of medicine* 345:631-637
- Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Bruss J, Zhang W (2003) Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *Neuroimage* 18:880-894
- Allen LS, Gorski RA (1991) Sexual dimorphism on the anterior commissure and the massa intermedia of the human brain. *The Journal of comparative neurology* 312:97-104
- Amado JA, Flórez J (2005) Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A eds. *Farmacología Humana* Barcelona: Masson S.A.
- Anderson IM, Del-Ben CM, Mckie S, Richardson P, Williams SR, Elliott R, Deakin JF (2007) Citalopram modulation of neuronal responses to aversive face emotions: a functional MRI study. *Neuroreport* 18:1351-1355
- Annett M (1967) The binomial distribution of right, mixed and left handedness. *The quarterly journal of experimental psychology* 19:327-333
- Ansseau M, Doumont A, Cerfontaine J, Mantanus H, Rousseau J, Timist-Berthier M (1984) Self-reports of anxiety level and EEG changes after a single dose of benzodiazepines. *Neuropsychobiology* 12:255-259
- Arce E, Simmons AN, Lovero KL, Stein MB, Paulus MP (2007) Escitalopram effects on insula and amygdala BOLD activation during emotional processing. *Psychopharmacology (Berl)* 196:661-672
- Arnold AP, Breedlove SM (1985) Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a reanalysis. *Hormonal Behavior* 19:469-498
- Arnold AP, Gorski RA (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annual review of neuroscience* 7:413-442
- Arnold AP, Rissman EF, De Vries GJ (2003) Two perspectives on the origin of sex differences in the brain. *Annals of the New York Academy of Science* 1007:176-188
- Arnold AP, van Nas A, Lusia AJ (2009) Systems biology asks new questions about sex differences. *Trends in endocrinology and metabolism* 20:471-476
- Aron A, Fletcher P, Bullmore E, Sahakian B, Robbins T (2003) Stop-signal inhibition disrupted by damage to right inferior frontal gyrus in humans. *Nature Neuroscience* 6:115-116

- Aron AR, Poldrack R (2006) Cortical and subcortical contributions to Stop signal response inhibition: role of the subthalamic nucleus. *Journal of neuroscience* 26:2424-2433
- Backus K, Arigoni M, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, Mohler H, Benson J (1993) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor deduced from mutation-induced rectification. *NeuroReport* 5:285-288
- Barbaccia ML, Serra M, Purdy RH, Biggio G (2001) Stress and neuroactive steroids. *International review of neurobiology* 46:243-272
- Bauer LO, Gross JB, Meyer RE, Greenblatt DJ (1997) Chronic alcohol abuse and the acute sedative and neurophysiologic effects of midazolam. *Psychopharmacology (Berl)* 133:293-299
- Baulieu E, Schumacher M, Koenig H, Jungtestas I, Akwa Y (1996) Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cellular and molecular neurobiology* 16:143-154
- Beaudoin J, Marrocco R (2005) Attentional validity effect across the human menstrual cycle varies with basal temperature changes. *Behavioural Brain Research* 158:23-29
- Beaumont JG, Mayes AR, Rugg MD (1978) Asymmetry in EEG alpha coherence and power: effects of task and sex. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 44:393-401
- Beer H, Bläuenstein P, Hasler P, Delaloye B, Riccabona G, Bangerl I, Hunkeler W, Bonetti E, Pieri L, Richards J, Al. E (1990) In vitro and in vivo evaluation of iodine-123-Ro 16-0154: a new imaging agent for SPECT investigations of benzodiazepine receptors. *Journal of Nuclear Medicine* 31:1007-1014
- Bellebaum C, Daum I (2009) Mechanisms of cerebellar involvement in associative learning. *Cortex* 47:128-136
- Benke D, Fritschy J, Trzeciak A, Bannwarth W, Mohler H (1994) Distribution, prevalence and drug binding profile of GABA_A receptor subtypes differing in b-subunit variant. *The Journal of biological chemistry* 269:27100-27107
- Berman K F, Schmidt P J, Rubinow DR, Danaceau MA, Van Horn JD, Esposito G, Ostrem JL, Weinberger DR (1997) Modulation of cognition-specific cortical activity by gonadal steroids: a positron-emission tomography study in women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:8836-88341
- Beyer C, González-Mariscal G (1991) Effects of progesterone and natural progestins in brain. En: Negro-Vilar A, Perez-Palacios G eds. *Reproduction, Growth and Development*. Raven Press: New York, pp. 440
- Bishop KM, Wahlsten D (1997) Sex differences in the human corpus callosum: myth or reality? *Neuroscience and biobehavioral reviews* 21:581-601
- Bitran D, Dowd JA (1996) Ovarian steroids modify the behavioral and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 125:65-73
- Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK (1991) Anxiolytic effects of 3 α -hydroxy-5(b)-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at GABA_A receptor. *Brain Research* 561:157-161
- Bitran D, Purdy RH, Kellogg CK (1993) Anxiolytic effects of progesterone is associated with increased in cortical allopregnanolone and GABA_A receptor function. *Pharmacology biochemistry and behaviour* 45: 423-428
- Blurton-Jones MM, Roberts JA, Tuszynski MH (1999) Estrogen receptor immunoreactivity in the adult primate brain: neuronal distribution and association with p75, trkA, and choline acetyltransferase. *The Journal of comparative neurology* 405:529-542

- Botvinick MM (2007) Conflict monitoring and decision making: reconciling two perspectives on anterior cingulate function. *Cognitive, affective & behavioral neuroscience* 7:356-366
- Boucart M, Waucquier N, Michael G, Libersa C (2007) Diazepam impairs temporal dynamic of visual attention. *Experimental and clinical psychopharmacology* 15:115-122
- Brugger P, Milicevic A, Regard M, Cook ND (1993) Random-number generation and the premenstrual cycle: preliminary evidence for a premenstrual alteration of frontal lobe functioning. *Perceptual and motor skills* 77:915-921
- Buchsbaum B, Greer S, Chang W, Berman K (2005) Meta-analysis of neuroimaging studies of the Wisconsin card-sorting task and component processes. *Human Brain Mapping* 25:35-45
- Bunge SA, Kahn I, Wallis JD, Miller EK, D A, Wagner AD (2003) Neural Circuits Subservicing the Retrieval and Maintenance of Abstract Rules. *Journal of Neurophysiology* 90:3419-3428
- Bunge SA (2004) How we use rules to select actions: a review of evidence from cognitive neuroscience. *Cognitive, affective & behavioral neuroscience* 4:564-579
- Burt D, Kamatchi G (1991) GABA_A receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. *FASEB* 5:2916-2923
- Bussey T, Wise S, Murray E (2001) The role of ventral and orbital prefrontal cortex in conditional visuomotor learning and strategy use in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience* 115:971-982
- Buzsáki G, Kaila K, Raichle M (2007) Inhibition and brain work. *Neuron* 56:771-783
- Cahill L (2006) Why sex matters for neuroscience. *Nature reviews of neuroscience* 7:477-84
- Cai W, Leung H (2009) Cortical activity during manual response inhibition guided by color and orientation cues. *Brain research* 1261:20-28
- Carrer H, Aoki A (1982) Ultrastructural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of ovariectomized rats after estrogen treatment. *Brain Research* 240:221-233
- Carter CS, Maddock R, Chaderjian M, Post R (1998) Attentional effects of single dose triazolam. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 22:279-292
- Casey B, Trainor R, Orendi J, Schubert A, Nystrom L, Giedd J, Castellanos FX, Haxby JV, Noll DC, Cohen JD, Forman SD DR, JL. R (1997) A developmental functional MRI study of prefrontal activation during performance of a go-no-go task. *Journal of Cognitive Neurosciences* 9:835-847
- Chambers CD, Bellgrove M a, Gould IC, English T, Garavan H, McNaught E, Kamke M, Mattingley JB (2007) Dissociable mechanisms of cognitive control in prefrontal and premotor cortex. *Journal of neurophysiology* 98:3638-3647
- Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss D (1998) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *Journal of Neuroscience* 349:115-121
- Christensen H, Fonnum F (1992) The ontogeny of the uptake systems for glutamate, GABA, and glycine in synaptic vesicles isolated from rat brain. *Neurochemical research* 17:457-462
- Christoff K, Gabrieli JDE (2000) The frontopolar cortex and human cognition: Evidence for a rostrocaudal hierarchical organization within the human prefrontal cortex. *Psychobiology* 28:168-186
- Christoff K, Keramatian K, Gordon A, Smith R, Mädler B (2009) Prefrontal organization of cognitive control according to levels of abstraction. *Brain Research* 1286:94-105
- Constantinidis C, Franowicz MN, Goldman-Rakic PS (2001) Coding specificity in cortical microcircuits: a multiple-electrode analysis of primate prefrontal cortex. *Journal of neuroscience* 21:3646-3655

- Copeland J, Chu S, Tremblay M (2004) Aging, physical activity, and hormones in women--a review. *Journal of aging and physical activity* 12:101-116
- Corbetta M, Shulman GL (2002) Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nature reviews. Neuroscience* 3:201-215
- Corpéchet C, Young J, Calvel M, Wehrey C, Veltz JN, Touyer G, Mouren M, Prasad VV, Banner C, Sjövall J (1993) Neurosteroids: 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one and its precursors in the brain, plasma, and steroidogenic glands of male and female rats. *Endocrinology* 133:1003-1009
- Corsi-Cabrera M, Herrera P, Malvido M (1989) Correlation between EEG and cognitive abilities: sex differences. *International Journal of Neuroscience* 45:133-141
- Corsi-Cabrera M, Muñoz-Torres Z, Río-Portilla Y del, Guevara M (2006) Power and coherent oscillations distinguish REM sleep, stage 1 and wakefulness. *International journal of psychophysiology* 60:59-66
- Corsi-Cabrera M, Ramos J, Guevara MA, Arce C, Gutiérrez S (1993) Gender differences in the EEG during cognitive activity. *International Journal of Neuroscience* 72:257-264
- Corsi-Cabrera M, Río-Portilla Y del, Muñoz-Torres Z (2007) Sex-Steroid Dimorphic Effects on Functional Brain Organization: Differences in Cognition, Emotion and Anxiolysis En: Czerbska M ed. *Psychoneuroendocrinology Research Trends*. New York: Nova Biomedical Books, pp. 528
- Corsi-Cabrera M, Sánchez AI, del-Río-Portilla Y, Villanueva Y, Pérez-Garci E (2003) Effect of 38 h of total sleep deprivation on the waking EEG in women: sex differences. *International journal of psychophysiology* 50:213-224
- Coull JT, Frith CD, Dolan RJ (1999) Dissociating neuromodulatory effects of diazepam on episodic memory encoding and executive function. *Psychopharmacology* 145:213-222
- Coull JT, Jones MEP, Egan TD, Frith CD, Maze M (2004) Attentional effects of noradrenaline vary with arousal level: selective activation of thalamic pulvinar in humans. *Neuroimage* 22:315-322
- Cowan RL, Frederick BdB, Rainey M, Levin JM, Maas LC, Bang J, Hennen J, Lukas SE, Renshaw PF (2000) Sex differences in response to red and blue light in human primary visual cortex: a bold fMRI study. *Psychiatry Research Neuroimaging* 100, 129–138
- Creutz LM, Kritzer MF (2002) Estrogen receptor-beta immunoreactivity in the midbrain of adult rats: regional, subregional, and cellular localization in the A10, A9, and A8 dopamine cell groups. *Journal of Neuroscience Research* 446:288-300
- Cunha M, Machado D, Bastos VH, Ferreira C, Cagy M, Basile L, Piedade R, Ribeiro P (2006) Neuromodulatory effect of bromazepam on motor learning: an electroencephalographic approach. *Neuroscience Letters* 407:166-170
- Curran H (1991) Benzodiazepines, memory, and mood: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 105:1-8
- Curran H, Pooviboonsuk P, Dalton J, Lader M (1998) Differentiating the effects of centrally acting drugs on arousal and memory: an event-related potential study of scopolamine, lorazepam and diphenhydramine. *Psychopharmacology (Berl)* 135:27-36
- Davatzikos C, Bryan RN (2002) Morphometric analysis of cortical sulci using parametric ribbons: a study of the central sulcus. *Journal of computer assisted tomography* 26:298-307
- Davies P, Hanna M, Hales T, Kirkness E (1997) Insensitivity to anaesthetic agents conferred by a class of GABA_A receptor subunit. *Nature* 385:820-823
- De Vries GJ (2004) Minireview: Sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation. *Endocrinology* 145:1063-1068

- De Vries GJ, Rissman EF, Simerly RB, Yang LY, Scordalakes EM, Auger CJ, Swain A, Lovell-Badge R, Burgoyne PS, Arnold AP (2002) A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *Journal of Neuroscience* 22:9005-9014
- De Vries GJ, Södersten P (2009) Sex differences in the brain: the relation between structure and function. *Hormones and behavior* 55:589-596
- de Witt H (1991) Diazepam preference in males with and without a family history of alcoholism. *NIDA research monograph* 105:319-320
- Deakin J, Aitken M, Dowson J, Robbins T, Sahakian B (2004) Diazepam produces disinhibitory cognitive effects in male volunteers. *Psychopharmacology* 173:88-97
- Décary A, Richer F (1995) Response selection deficits in frontal excisions. *Neuropsychologia* 33:1243-1253
- Del-Ben CM, Ferreira CA, Sanchez TA, Alves-Neto WC, Guapo VG, de Araujo DB, Graeff FG (2010) Effects of diazepam on BOLD activation during the processing of aversive faces. *Journal of Psychopharmacology: En línea*
- Detsche H, Etlinger SC, Petsche H (1998) EEG and thinking: power and coherence analysis of cognitive processes. Vienna: Austrian Academy of Sciences, pp. 384
- Dewing P, Chiang CWK, Sinchak K, Sim H, Fernagut PO, Kelly S, Chesselet MF, Micevych PE, Albrecht KH, Harley VR, Vilain E (2006) Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr ent Biology* 16:415–420
- Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ, Goodacre S, Lincoln RJ, Cook SM, Conley R, Hallett D, Humphries AC, Thompson SA, Wafford KA, Street LJ, Castro JL, Whiting PJ, Rosahl TW, Atack JR, McKernan RM, Dawson GR, Reynolds DS. (2005) Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABA_A receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Journal of Neuroscience* 25:10682-10688
- Donohue S, Wendelken C, Crone E, Bunge S (2005) Retrieving rules for behavior from long-term memory. *NeuroImage* 26:1140-1149
- Dorion, AA, Chantome M, Hasboun D, Zouaoui A, Marsault C, Capron C, Duyme M (2000) Hemispheric asymmetry and corpus callosum morphometry: a magnetic resonance imaging study. *Neuroscience Research* 36:9-13
- Drewe E (1975a) An experimental investigation of Luria's theory on the effects of frontal lobe lesions in man. *Neuropsychologia* 13:421-429
- Drewe E (1975b) Go -- no go learning after frontal lobe lesions in humans. *Cortex* 11:8-16
- Dubb A, Gur R, Avants B, Gee J (2003) Characterization of sexual dimorphism in the human corpus callosum. *Neuroimage* 20:512-519
- Epperson CN, Haga K, Mason GF, Sellers E, Gueorguieva R, Zhang W, Weiss E, Rothman DL, Krystal JH (2002) Cortical gamma-aminobutyric acid levels across the menstrual cycle in healthy women and those with premenstrual dysphoric disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Archives of general psychiatry* 59:851-858
- Evans AC, Kamber M, Collins DL, Macdonald D (1994) An MRI-based probabilistic atlas of neuroanatomy. En: Shorvon S, Fish D, Andermann F, Bydder GM, Stefan H eds. *Magnetic resonance scanning and epilepsy*. New York: Plenum, pp. 334
- Federman DD (2006) The biology of human sex differences. *The New England journal of medicine* 354:1507–1514

- Fernandez-Guasti A, Martínez-Mota L, Estrada-Camarena C, López-Rubalcava C (1999) Chronic Treatment With Desipramine Induces an Estrous Cycle-Dependent Anxiolytic-Like Action in the Burying Behavior , But Not in the Elevated Plus-Maze Test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 63:13-20
- Fernández-Guasti A, Picazo O (1995) Flumazenil blocks the anxiolytic action of allopregnanolone. *European Journal of Pharmacology* 281:113-115
- Filipek P A, Richelme C, Kennedy D N, CavinessVSJr (1994) The young adult human brain: an MRI-based morphometric analysis *Cerebral Cortex* 4: 344-360
- Fingelkurts AA, Fingelkurts AA, Kivisaari R, Pekkonen E, Ilmoniemi RJ, Kähkönen S (2004) Local and remote functional connectivity of neocortex under the inhibition influence. *Neuroimage* 22:1390-1406
- Fingelkurts AA (2001) Operational architectonics of the human brain biopotential field: Towards solving the mind-brain problem. *Brain and Mind* 2:261–296
- Fischer H, Fransson P, Wright CI, Backman L (2004) Enhanced occipital and anterior cingulate activation in men but not in women during exposure to angry and fearful male faces. *Cognitive affective & behavioural neuroscience* 4: 326-334
- Fluck E, File SE, Springett J, Kopelman MD, Rees J, Orgill J (1998) Does the Sedation Resulting from Sleep Deprivation and Lorazepam Cause Similar Cognitive Deficits? *Science* 59:909-915
- Forger NG (2009) Control of cell number in the sexually dimorphic brain and spinal cord. *Journal of neuroendocrinology* 21:393–399
- Frederikse ME, Lu A, Aylward E, Barta P, Pearlson G (1999) Sex differences in the inferior parietal lobule. *Cerebral Cortex* 9:896-901
- Friedman H, Ochs HR, Greenblatt DJ, Shader RI (1985) Tissue distribution of diazepam and its metabolite desmethyldiazepam: a human autopsy study. *Journal of clinical pharmacology* 25:613-615
- Frith C, Richardson J, Samuel M, Crow T, McKenna P (1984) The effects of intravenous diazepam and hyoscine upon human memory. *The Quarterly journal of experimental psychology* 36A:133-144
- Frye CA, Bayon LE (1998) Seizure activity is increased in endocrine states characterized by decline in endogenous levels of the neurosteroid 3 alpha,5 alpha-THP. *Neuroendocrinology* 68:272-280
- Fuster J, Alexander G (1973) Neuron activity related to short-term memory. *Science* 173:652-654
- Gadea M, Marti-Bonmati L, Arana E, Espert R, Casanova V, Pascual A (2002) Dichotic listening and corpus callosum magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis with emphasis on sex differences. *Neuropsychology* 16:275-281
- Gallo M, Smith S (1993) Progesterone withdrawal decreases latency to and increases duration of electrified prod burial: a possible rat model of PMS anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 46:897–904
- Garavan H, Hester R, Murphy K, Fassbender C, Kelly C (2006) Individual differences in the neuroanatomy of cognitive control. *Brain Research* 1105:130-142
- Gauthier P, Jouffray L, Gottesmann R M (1980) Electroencephalographic recordings during parachute jump sessions. *Aviation, space, and environmental medicine* 50:336-338
- Gee KW, Bolger MB, Brinton RE, Coirini H, McEwen BS (1998) Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure–activity requirements, regional dependence and mechanisms of action. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 246:803–812
- Georgopoulos AP, Whang K, Georgopoulos MA, Tagaris GA, Amirikian B, Richter W, Kim SG, Ugurbil K, (2001) Functional magnetic resonance imaging of visual object construction and shape

discrimination: relations among task, hemispheric lateralization, and gender. *Journal of Cognitive Neuroscience* 13: 72-89

- Ghoneim M, Mewaldt S (1990) Benzodiazepines and human memory: a review. *Anesthesiology* 72:926-938
- Gibson RS (1990) Principles of nutritional assessment. New York: Oxford University Press, pp 691
- Gillies GE, McArthur S (2010) Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacological reviews* 62:155-198
- Goldberg E, Podell K, Lovell M (1994) Lateralization of frontal lobe functions and cognitive novelty. *Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 6, 371-378
- Goldstein JM, Jerram M, Abbs B, Whitfield-Gabrieli S, and Makris N (2010) Sex differences in stress response circuitry activation dependent on female hormonal cycle. *Journal of Neuroscience* 30:431-438
- Goldstein JM, Seidman L J, O'Brien LM, Horton NJ, Kennedy DN, Makris N, Caviness VS Jr, Faraone SV, Tsuang MT (2002) Impact of normal sexual dimorphisms on sex differences in structural brain abnormalities in schizophrenia assessed by magnetic resonance imaging. *Archives of general psychiatry* 59:154-164
- Good CD, Johnsrude I, Ashburner J, Henson R N, Friston KJ, Frackowiak RS (2001) Cerebral asymmetry and the effects of sex and handedness on brain structure: a voxel-based morphometric analysis of 465 normal adult human brains. *Neuroimage* 14:685-700
- Gorissen MEE, Eling PATM (1998) Dual task performance after diazepam intake: can resource depletion explain the benzodiazepine-induced amnesia? *Psychopharmacology* 138:354-361
- Gould E, McEwen BS (1993) Neuronal birth and death. *Current opinion in neurobiology* 3:676-682
- Grabowski TJ, Damasio H, Eichhorn GR, and Tranel D (2003) Effects of gender on blood flow correlates of naming concrete entities. *Neuroimage* 20:940-954
- Gray CM (1999) The Temporal Correlation Hypothesis Review of Visual Feature Integration: Still Alive and Well. *Neuron* 24:31-47
- Green J, McElholm A, King D (1996) A comparison of the sedative and amnestic effects of chlorpromazine and lorazepam. *Psychopharmacology* 128:67-73
- Greenblatt D, Ehrenberg B, Gunderman J, Locniskar A, Scavone J, Harmatz J, Shader R (1989) Pharmacokinetic and electroencephalographic study of intravenous diazepam, midazolam and placebo. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 45:356-365
- Greenblatt DJ, Gan L, Harmatz JS, Shader RI (2005) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-dose triazolam: electroencephalography compared with the Digit-Symbol Substitution Test. *British Journal of Clinical Pharmacology* 60:244-248
- Greenblatt DJ, Harmatz JS, von Moltke LL, Wright CE, Shader RI (2004) Age and gender effects on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of triazolam, a cytochrome P450 3A substrate. *Clinical pharmacology and therapeutics* 76:467-479
- Greenblatt DJ, Harmatz JS, von Moltke LL, Wright CE, Durol AL, Harrel-Joseph LM, Shader RI (2000) Comparative kinetics and response to the benzodiazepine agonists triazolam and zolpidem: evaluation of sex-dependent differences. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 293:435-443
- Gründer G, Siessmeier T, Lange-Asschenfeldt C, Vernaleken I, Buchholz H, Stoeter P, Drzezga A, Lüddens H, Rösch F, Bartenstein P (2001) [¹⁸F]Fluoroethylflumazenil: a novel tracer for PET imaging of human benzodiazepine receptors. *European journal of nuclear medicine* 28:1463-1470

- Gur R C, Gunning-Dixon F, Bilker WB, Gur RE (2002) Sex differences in temporo-limbic and frontal brain volumes of healthy adults. *Cerebral Cortex* 12:998-1003
- Gur RC, Mozley LH, Mozley PD, Resnick SM, Karp JS, Alavi A, Arnold SE, Gur RE, (1995) Sex differences in regional cerebral glucose metabolism during a resting state. *Science* 267:528-531
- Gur RE, Gur RC (1990) Gender differences in regional cerebral blood flow. *Schizophrenia Bulletin* 16:247-254
- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M, Kato J (1992) Expression of progesterone receptor in the neonatal rat brain cortex: detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 41:637-640
- Halbreich U, Petty F, Yonkers K, Kramer GL, Rush AJ, Bibi KW (1996) Low plasma gamma-aminobutyric acid levels during the late luteal phase of women with premenstrual dysphoric disorder. *American Journal of Psychiatry* 153:718-720
- Halpern DF, Tan U (2001) Stereotypes and steroids: using a psychobiosocial model to understand cognitive sex differences. *Brain and cognition* 45:392-414
- Hampson E (1990) Variation in sex-related cognitive abilities across the menstrual cycle. *Brain and Cognition* 4:26-43
- Hantraye P, Kajijima M, Prenant C, Guibert B, Sastre J, Crouzel M, Naquet, R., Comar, D., Maziere M (1984) Central type benzodiazepine binding sites: a positron emission tomography study in the baboon's brain. *Neuroscience letters* 48:115-120
- Harlan RE (1988) Regulation of neuropeptide gene expression by steroid hormones. *Molecular Neurobiology* 2: 183-200
- Hausmann M, Gunturkun O (2000) Steroid fluctuations modify functional cerebral asymmetries: the hypothesis of progesterone-mediated interhemispheric decoupling. *Neuropsychologia* 38:1362-1374
- Hennessey M, Kirkby K, Montgomery I (1991) Comparison of the effects of midazolam and diazepam. *Psychopharmacology* 103:545-550
- Hindmarch I, Trick L, Ridout F (2005) A double-blind, placebo- and positive-internal-controlled (alprazolam) investigation of the cognitive and psychomotor profile of pregabalin in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 183:133-143
- Hoshi E (2008) Differential Involvement of the Prefrontal, Premotor and Primary Motor Cortices in Rule-Based Motor Behavior En: Bunge SA, Wallis JD eds. *Neuroscience of Rule Behavior* New York: Oxford University Press, pp. 472
- Huettel SA, McCarthy G (2004) What is odd in the oddball task? Prefrontal cortex is activated by dynamic changes in response strategy. *Neuropsychologia* 42:379-386
- Huettel S (2004) Linking Hemodynamic and Electrophysiological Measures of Brain Activity: Evidence from Functional MRI and Intracranial Field Potentials. *Cerebral Cortex* 14:165-173
- Imas O, Ropella KM, Wood JD, Hudetz AG (2006) Isoflurane disrupts antero-posterior phase synchronization of flash-induced field potentials in the rat. *Neuroscience Letters* 402:216-221
- Jääskeläinen I, Hirvonen J, Saher M, Pekkonen E, Sillanauke P, Näätänen R, Tiitinen H (1999) Benzodiazepine temazepam suppresses the transient 40 Hz response amplitude in humans. *Neuroscience Letters* 268:105-107
- Jackson A, Stephens D, Duka T (2005) Gender differences in response to lorazepam in a human drug discrimination study. *Journal of Psychopharmacology* 19:614-619
- Jacobsen C (1936) Studies of cerebral function in primates: I. The functions of the frontal association areas in monkeys. *Comparative Psychological Monographs* 13:1-68

- Jedlicka P, Backus KH (2006) Inhibitory transmission, activity-dependent ionic changes and neuronal network oscillations. *Physiology Research* 55:139-149
- Johnson M, Raye C, Mitchell K, Greene E, Anderson A (2003) fMRI evidence for an organization of prefrontal cortex by both type of process and type of information. *Cerebral Cortex* 13:265-273
- Jung-Testas Y, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE (1996) The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cellular and molecular neurobiology* 16:439-443
- Kajantie E, Phillips D (2005) The effects of sex and hormonal status on the physiological response to acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 31:151-178
- Kastrup A, Li TQ, Glover GH, Kruger G, Moseley ME (1999) Gender differences in cerebral blood flow and oxygenation response during focal physiologic neural activity *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 19:1066-1071
- Kato J, Onouchi T (1981) Progesterone receptors in the cerebral cortex of neonatal female rats. *Development Neuroscience* 4:427-432
- Kawashima R, Satoh K, Itoh H, Ono S, Furumoto S, Gotoh R, Koyama M, Yoshioka S, Takahashi T, Takahashi K, Yanagisawa T FH (1996) Functional anatomy of go/no-go discrimination and response selection- a PET study in man. *Brain Research* 728:79-89
- Kelly SJ, Ostrowski NL, and Wilson MA (1999) Gender differences in brain and behavior: hormonal and neural bases. *Pharmacol Biochem Behav* 64:655–664.
- Kennan P A, Stern RA, Janowsky DS, Pedersen C A (1992) Psychological aspects of the premenstrual syndrome, I: Cognition and memory. *Psychoneuroendocrinology* 17: 179-187
- Khan Z, Gutierrez A, De Blas A (1996) The alpha1 and alpha6 subunits can coexist in the same cerebellar GABA_A receptor maintaining their individual benzodiazepine-binding specificities. *Journal of Neurochemistry* 66:685-691
- Kinoshita T, Michel CH, Yagyu T, Lenmann D (1994) Diazepam and sulfiride effects on frequency domain EEG source locations. *Neuropsychobiology* 30:126-131
- Kleinschmidt A, Bruhn H, Krüger G, Merboldt KD, Stoppe G, Frahm J (1999) Effects of sedation, stimulation, and placebo on cerebral blood oxygenation: a magnetic resonance neuroimaging study of psychotropic drug action. *NMR in biomedicine* 12:286-292
- Knaus TA, Bolich AM, Corey DM, Lemen LC, Foundas AL (2004) Sex-linked differences in the anatomy of the persylvian language cortex: a volumetric MRI study of gray matter volumes. *Neuropsychology* 18:738-747
- Kojima S, Goldman-Rakic P (1984) Functional analysis of spatially discriminative neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. *Brain Research* 291:229-240
- Korpi ER, Gründer G, Lüddens H (2002) Drug interactions at GABA(A) receptors. *Progress in neurobiology* 67:113-159
- Kovalev VA, Kruggel F, von Cramon DY (2003) Gender and age effects in structural brain asymmetry as measured by MRI texture analysis. *Neuroimage* 19: 895-905
- Kow LM, Mobbs CV, Pfaff DW (1994) Roles of second-messenger systems and neuronal activity in the regulation of lordosis by neurotransmitters, neuropeptides and estrogen: a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 18:251-268
- Krause BJ, Horwitz B, Taylor JG, Schmidt D, Mottaghy FM, Herzog H, Halsband U, Müller-Gärtner H, (1999) Network analysis in episodic encoding and retrieval of word-pair associates: a PET study. *European journal of neuroscience* 11:3293-3301

- Kroboth PD, McAuley JW (1997) Progesterone: does it affect response to drug? *Psychopharmacology bulletin* 33:297-301
- Lancel M, Faulhaber J, Holsboer F, Ruprecht R (1996) Progesterone induces changes in sleep comparable to those of agonistic GABA_A receptor modulators. *American Journal of Physiology* 271:E763–E772
- Lee TMC, Liu H, Chan CCH, Fang S, Gao JH (2002) Neural activities associated with emotion recognition observed in men and women. *Molecular psychiatry* 10:450-455
- Lee TMC, Liu H, Hoosian R, Liao W, Wu C, Yuen KSL, Chan CCH, Fox PT, Gao JH (2002) Gender differences in neural correlates of recognition of happy and sad faces in humans assessed by functional magnetic resonance imaging. *Neuroscience Letters* 333:13-16
- Legrand F, Vidailhet P, Danion J, Grangé D, Giersch A, Van der Linden M, Imbs J (1995) Time course of the effects of diazepam and lorazepam on perceptual priming and explicit memory. *Psychopharmacology (Berl)* 18:475-479
- Leufkens TRM, Vermeeren A, Slink BE, Ruitenbeek P van, Ramaekers JG (2007) Cognitive, psychomotor and actual driving performance in healthy volunteers after immediate and extended release formulations of alprazolam 1 mg. *Psychopharmacology* 191:951-9
- Levin JM, Ross MH, Mendelson JH, Mello NK, Cohen BM, Renshaw PF (1998) Sex differences in blood-oxygenation-level-dependent functional MRI with primary visual stimulation. *American Journal of Psychiatry* 155:434-436
- Levine S (1966) Sex differences in the brain. *Scientific American* 214:84-90
- Li C, Huang C, Constable R, Sinha R (2006) Imaging response inhibition in a stop-signal task: neural correlates independent of signal monitoring and post-response processing. *Journal of Neuroscience* 28:186-192
- Li ZJ, Matsuda H, Asada T, Ohnishi T, Kanetaka H, Imabayashi E, Tanaka F (2004) Gender differences in brain perfusion 99mTc-ECD SPECT in aged healthy volunteers after correction for partial volume effects. *Nuclear Medicine Communication* 25:999-1005
- Lightfoot J (2008) Sex hormones regulation of rodent physical activity: a review. *International journal of biological sciences* 4:126-132
- Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A (2001) Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412:150-157
- Lord T, Taylor K (1992) Monthly fluctuations in task concentration in female students. *Perceptual and motor skills* 72:435-439
- Lucchesi LM, Pompéia S, Manzano GM, Kohn AF, Galduroz JCF, Bueno OFA, Tufik S (2003) Flunitrazepam-induced changes in neurophysiological, behavioural, and subjective measures used to assess sedation. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27:525-533
- Luders E, Narr K L, Thompson PM, Rex DE, Jancke L, Steinmetz H, Toga AW (2004) Gender differences in cortical complexity. *Nature Neuroscience* 7: 799-800
- Maeda J, Sahara T, Kawabe K, Okauchi T, Obayashi S, Hojo J, Suzuki K (2003) Visualization of alpha5 subunit of GABA_A/benzodiazepine receptor by 11C Ro15-4513 using positron emission tomography. *Synapse* 47:200-208
- Maggi A, Perez J (1984) Progesterone and estrogen in rat brain: Modulation of GABA (3,-aminobutyric acid) receptor activity. *European Journal of Pharmacology* 103:165-168
- Maggi A, Zucchi I (1987) Sexual differentiation of mammalian frontal cortex. *Life Science* 40:1155-1160
- Majeswska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232:1004-1007

- Majewska MD (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. Mechanisms of action and physiological significance. *Progress in neurobiology* 38:379-395
- Mandena J, Kuck M, Danhof M (1992) Differences in intrinsic efficacy of benzodiazepines are reflected in their concentration-EEG effect relationship. *British journal of pharmacology* 105:164-170
- Martin J, Schoch P, Jenck F, Moreau J, Haefely W (1993) Pharmacological characterization of benzodiazepine receptor ligands with intrinsic efficacies ranging from high to zero. *Psychopharmacology (Berl)* 114:415-422
- Masson GS, Mestre DR, Martineau F, Soubrouillard C, Brefel C, Rascol O, Blin O (2000) Lorazepam-induced modifications of saccadic and smooth-pursuit eye movements in humans: attentional and motor factors. *Behavioural brain research* 108:169-180
- Mathew RJ, Wilson WH, Daniel DG (1985) The effect of nonsedating doses of diazepam on regional cerebral blood flow. *Biological Psychiatry* 20:1109-1116
- Matthew E, Andreason P, Pettigrew K, Carson RE, Herscovitch P, Cohen R, King C, Johanson CE, Greenblatt DJ, Paul SM (1995) Benzodiazepine receptors mediate regional blood flow changes in the living human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:2775-2779
- Maziere M, Hantraye P, Prenant C, Sastre J, Comar D (1984) Synthesis of ethyl-8-fluoro-5,6-dihydro-5-[¹¹C]methyl-6-oxo-4Himidazo-[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3-carboxylate (Ro 15-1788-11C): a specific radioligand for the in vivo study of central benzodiazepine receptors by positron emission tomography. *The International journal of applied radiation and isotopes* 35:973-976
- Mccabe S (2005) Correlates of nonmedical use of prescription benzodiazepine anxiolytics: results from a national survey of U.S. college students. *Drug Alcohol Depend* 79:53-62
- McCarthy MM (2008) Estradiol and the developing brain. *Physiological reviews* 88:91-124
- McCarthy MM, Konkle AT (2005) When is a sex difference not a sex difference? *Frontiers in Neuroendocrinology* 26:85-102
- McEwen BS (2001) Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of applied physiology* 91:2785-27801
- McEwen BS (2001) Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of applied physiology* 91:2785-2801
- McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nature Neuroscience* 3:587-592
- Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H (1999) Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological reviews* 51:63-81
- Minc D, Machado S, Bastos VH, Machado D, Cunha M, Cagy M, Budde H, Basile L, Piedade R, Ribeiro P (2010) Gamma band oscillations under influence of bromazepam during a sensorimotor integration task: an EEG coherence study. *Neuroscience Letters* 469:145-149
- Mintzer MZ, Griffiths RR (1999) Triazolam and zolpidem: effects on human memory and attentional processes. *Psychopharmacology* 144:8-19
- Mintzer MZ, Griffiths RR, Contoreggi C, Kimes AS, London ED, Ernst M (2001) Effects of Triazolam on brain activity during episodic memory encoding. *Neuropsychopharmacology* 25:744-756

- Mishkin M, Ungerleider L (1982) Contribution of striate inputs to the visuospatial functions of parieto-preoccipital cortex in monkeys. *Behavioural Brain Research* 6:57-77
- Moran M, Goldberg M, Smith S (1998) Progesterone withdrawal II: Insensitivity to the sedative effects of a benzodiazepine. *Brain Research* 507:91–100
- Moro M, Lizasoain I (2003) Benzodiazepinas, barbitúricos y otros hipnóticos. En: Lorenzo P, Ladero J, Leza J, Lizasoain I eds. *Drogodependencias: farmacología, patología, psicología, legislación*. España: Médica Panamericana, pp.444
- Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM (2004) Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nature neuroscience* 7:1034–1039
- Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, Hojo Y, Komatsuzaki Y, Sato R, Murakami G, Kimoto T, Kawato S (2011) Automated Analysis of Spines from Confocal Laser Microscopy Images: Application to the Discrimination of Androgen and Estrogen Effects on Spinogenesis. *Cerebral Cortex*: En línea
- Muñoz-Torres Z (2005) Cambios en la Actividad Eléctrica Cerebral Durante una Tarea de Atención Visual Sostenida Bajo el Efecto del Diazepam. Tesis de Licenciatura, UNAM, pp. 82
- Muñoz-Torres Z, Río-Portilla Y del, Corsi-Cabrera M (2011) Diazepam-induced changes in EEG oscillations during performance of a sustained attention task. *Journal of clinical psychophysiology*: En prensa
- Murray E, Bussey T, Wise S (2000) Role of prefrontal cortex in a network for arbitrary visuomotor mapping. *Experimental Brain Research* 113:114-129
- Nabekura J, Oomura Y, Minami T, Mizuno Y, Fukuda A (1986) Mechanism of the rapid effect of 17 beta-estradiol on medial amigdala neurons. *Science* 233:226-228
- Naninck E, Lucassen P, Bakker J (2011) Sex differences in adolescent depression: do sex hormones determine vulnerability? *Journal of neuroendocrinology* 23:383-392
- Nopoulos P, Flaum M, O'Leary D, Andreasen NC (2000) Sexual dimorphism in the human brain: evaluation of tissue volume, tissue composition and surface anatomy using magnetic resonance imaging *Psychiatry research* 98: 1-13
- Norberg L, Backstrom T, Wahlstrom G (1999) Anaesthetic effects of pregnanolone in combination with allopregnanolone, thiopental, hexobarbital and fluorazepam: an EEG study in the rat. *British journal of anaesthesia* 82:731
- Nunez P (2000) Toward a quantitative description of large-scale neocortical dynamic function and EEG. *The behavioural and the brain sciences* 3:371-398
- Olesen KM, Auger AP (2005) Sex differences in Fos protein expression in the neonatal rat brain. *Journal of Neuroendocrinology* 17:255-261
- Ollinger J, Fessler J (1997) Positron-emission tomography. *Signal Processing Magazine, IEEE* 14:43-55
- Olsen R, Tobin A (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. *FASEB* 4:1469-1480
- Palva ES (1985) Gender-related differences in diazepam effects on performance. *Medical biology* 63:92-95
- Panek DU, Dixon WR (1986) Effect of continuous intraventricular estrogen or catechol estrogen treatment on catecholamine turnover in various brain regions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 236:646-652
- Paredes NP, Miasso AI, Tirapelli CR (2008) Consumption of benzodiazepines without prescription among first-year nursing students at the University of Guayaquil, school of nursing, Ecuador. *Revista latinoamericana Enfermagem* 16:634-639

- Paulus MP, Feinstein JS, Castillo G, Simmons AN, Stein MB (2005) Dose-dependent decrease of activation in bilateral amygdala and insula by lorazepam during emotion processing. *Archives of general psychiatry* 62:282-288
- Pawlak J, Beyer C (2005) Developmental expression of MNAR mRNA in the mouse brain. *Cell and tissue research* 320:545-549
- Perez J, Zucchi I, Maggi A (1986) Sexual dimorphism in the response of the GABAergic system to estrogen administration. *Journal of Neurochemistry* 47:1798-1803
- Perez J, Zucchi I, Maggi A (1988) Estrogen modulation of the 3'-aminobutyric acid receptor complex in the central nervous system of rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 244:1005-1010
- Perlman WR, Tomaskovic-Crook E, Montague DM, Webster MJ, Rubinow DR, Kleinman JE, Weickert CS (2005) Alteration in estrogen receptor alpha mRNA levels in frontal cortex and hippocampus of patients with major mental illness. *Biology Psychiatry* 58:812-824
- Persson A, Ehrin E, Eriksson L, Farde L, Hedström C, Litton J, Mindus P, Sedvall G (1985) Imaging of [¹¹C]-labelled Ro 15-1788 binding to benzodiazepine receptors in the human brain by positron emission tomography. *Journal of psychiatric research* 19:609-622
- Petersen SE, Corbetta M, Miezin FM, Shulman GL (1994) PET studies of parietal involvement in spatial attention: comparison of different task types. *Canadian journal of experimental psychology* 48:319-338
- Petrides M, Pandya D (1984) Projections to the frontal cortex from the posterior parietal region in the rhesus monkey. *The Journal of comparative neurology* 228:105-116
- Petrides M, Pandya D (1999) Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. *The European journal of neuroscience* 11:1011-1036
- Petrides M, Pandya D (2002) Association pathways of the prefrontal cortex and functional observations. En: Stuss D, Knight R eds. *Principles of Frontal Lobe Function*. New York: Oxford University Press, pp. 616
- Picazo O, Fernández-Guasti A (1995) Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Research* 680:135-141
- Picton TW, Stuss DT, Alexander MP, Shallice T, Binns M a, Gillingham S (2007) Effects of focal frontal lesions on response inhibition. *Cerebral cortex* 17:826-838
- Piefke M, Weiss PH, Markowitsch HJ, and Fink GR (2005) Gender differences in the functional neuroanatomy of emotional episodic autobiographical memory. *Human Brain Mapping* 24:313-324
- Pigot TA (1999) Gender differences in the epidemiology and treatment of anxiety disorders. *Journal of Clinical Psychiatry* 60:4-15
- Poldrack R, Clark J, Pare-Blagoev E, Shohamy D, Creso Moyano J, Myers C, Gluck M (2001) Interactive memory systems in the human brain. *Nature* 414:546-550
- Pompéia S, Manzano GM, Pradella-Hallinan M, Bueno OF (2007) Effects of lorazepam on deductive reasoning. *Psychopharmacology* 194:527-536
- Pompéia S, Lucchesi LM, Bueno OF a, Manzano GM, Tufik S (2004) Zolpidem and memory: a study using the process-dissociation procedure. *Psychopharmacology* 174:327-333
- Pompéia S, Pradella-Hallinan M, Manzano G, Bueno O (2008) Effects of lorazepam on visual perceptual abilities. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 23:183-192
- Posner MI, Raichle ME (1997) *Images of Mind*. New York: Freeman, pp. 256

- Preston G, Broks P, Traub M, Ward C, Poppleton P, Stahl S (1988) Effects of lorazepam on memory, attention and sedation in man. *Psychopharmacology* 95:208–215
- Pritchett D, Seeburg P (1991) gamma-Aminobutyric acid type A receptor point mutation increases the affinity of compounds for the benzodiazepine site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:1421-1425
- Puia G, Santi MR, Vicini S (1990) Neurosteroids act on recombinant human GABA_A receptors. *Neuron* 4:759–765
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH Jr, Paul SM (1991) Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88:4553-4557
- Ragland JD, Coleman AR, Gur RC, Glahn DC, Gur RE (2000) Sex differences in brain –behavior relationships between verbal episodic memory and resting regional cerebral blood flow. *Neuropsychologia* 38:451-461
- Ragnehed M, Håkansson I, Nilsson M, Lundberg P, Söderfeldt B, Engström M (2007) Influence of diazepam on clinically designed fMRI. *Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 19:164-172
- Ramos J, Corsi-Cabrera M, Guevara MA, Arce C (1993) EEG activity during cognitive performance in women. *International Journal of neuroscience* 69:185-195
- Ramos J, Corsi-Cabrera M (1989) Does brain electrical activity react to music? *International Journal of Neurosciences* 47:351-357
- Rang H, Dale M, Ritter J, Gardner P (2001) *Pharmacology*. UK: Churchill Livingstone, pp.844
- Ravizza T, Veliskova J, Moshe SL (2003) Testosterone regulates androgen and estrogen receptor immunoreactivity in rat substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience Letters* 338:57-61
- Reilly MT, Crabbe JC, Rustay NR, Finn DA (2000) Acute neuroactive steroid withdrawal in withdrawal seizure-prone and withdrawal seizure-resistant mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 67:709–717
- Reinsel RA, Veselis RA, Dnistrian AM, Feshchenko VA, Beattie BJ, Duff MR (2000) Midazolam decreases cerebral blood flow in the left prefrontal cortex in a dose-dependent fashion. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 3: 117-127
- Renfree MB, Short RV (1988) Sex determination in marsupials: evidence for a marsupial-eutherian dichotomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B:Biological Sciences* 322:41–53
- Rich JB, Svoboda E, Brown GG (2006) Diazepam-induced prospective memory impairment and its relation to retrospective memory, attention, and arousal. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 21:101–108
- Robbins T, Semple J, Kumar R, Truman M, Shorter J, Ferraro A, Fox B, McKay G (1997) Effects of scopolamine on delayed-matching-to-sample and paired associates tests of visual memory and learning in human subjects: comparison with diazepam and implications for dementia. *Psychopharmacology* 134:95-106
- Rodriguez G, Warkentin S, Risberg J, Rosadini G (1988) Sex differences in regional cerebral blood flow. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 8:783-789
- Rodríguez-Sierra JF, Howard JL, Pollard GT (1984) Effects of ovarian hormones on conflict behavior. *Psychoneuropharmacology* 9:293–300

- Romano-Torres M, Borja-Lascurain E, Chao-Rebolledo C, del Río-Portilla Y, Corsi-Cabrera M (2002) Effects of diazepam on EEG power and coherent activity: sex differences. *Psychoneuroendocrinology* 27:821-833
- Roy-Byrne P, Fleishaker J, Arnett C, Dubach M, Stewart J, Radant A, Veith R, Graham M (1993) Effects of acute and chronic alprazolam treatment on cerebral blood flow, memory, sedation, and plasma catecholamines. *Neuropsychopharmacology* 8:161-169
- Rubia K, Russell T, Overmeyer S, Brammer M, Bullmore E, Sharma T, Simmons A, Williams SC, Giampietro V, Andrew CM TE (2001) Mapping motor inhibition: conjunctive brain activations across different versions of go/no-go and stop tasks. *Neuroimage* 13:250-261
- Rubinow DR, Schmidt P J (2006) Gonadal steroid regulation of mood: the lessons of premenstrual syndrome. *Frontiers in neuroendocrinology* 27:210-216
- Rusted J, Eaton-Williams P, Warburton D (1991) A comparison of the effects of scopolamine and diazepam on working memory. *Psychopharmacology* 105:442-445
- Salat D, Ward A, Kaye JA, Janowsky JS (1997) Sex differences in the corpus callosum with aging. *Neurobiology of aging* 18:191-197
- Salmi E, Aalto S, Hirvonen J, Långsjö J, Maksimow A, Oikonen V, Metsähonkala L, Virkkala J, Någren K, Scheinin H (2008) Measurement of GABA_A receptor binding in vivo with [¹¹C]flumazenil: a test-retest study in healthy subjects. *Neuroimage* 41:260-269
- Sampaio I, Puga F, Veiga H, Cagy M, Piedade R, Ribeiro P (2007) Influence of bromazepam on cortical interhemispheric coherence. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 65:77-81
- Schlaepfer TE, Harris, G J, Tien AY, Peng L, Lee S, Pearlson GD (1995) Structural differences in the cerebral cortex of healthy female and male subjects: a magnetic resonance imaging study. *Psychiatry research* 61:129-135
- Schlosser R, Hutchinson M, Joseffer S, Rusinek H, Saarimaki A, Stevenson J, Dewey SL, Brodie JD (1998) Functional magnetic resonance imaging of human brain activity in a verbal fluency task. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* 64: 492-498
- Schulz P, Walker JP, Peyrin L, Soulier V, Curtin F, Steimer T (1996) Lower sex hormones in men during anticipatory stress. *Neuroreport* 7:3101-3104
- Shaywitz BA, Shaywitz SE, Pugh KR, Constable RT, Skudlarski P, Fulbright RK, Bronen RA, Fletcher JM, Shankweiler DP, Katz L, Gore JC (1995) Sex differences in the functional organization of the brain for language. *Nature* 373:607-609
- Sheng Z, Kawano J, Yanai A, Fujinaga R, Tanaka M, Watanabe Y, Shinoda K (2004) Expression of estrogen receptors (alpha, beta) and androgen receptor in serotonin neurons of the rat and mouse dorsal raphe nuclei; sex and species differences. *Neuroscience Research* 49:185-196
- Shughrue P J, Sar M, Stumpf WE (1992) Progestin target cell distribution in forebrain and midbrain regions of the 8-day postnatal mouse brain. *Endocrinology* 130:3650-3659
- Sierra JC, Luna-Villegas G, Buela-Casal G, Fernández-Guardiola A (1997) The assessment of residual effects of a single dose of diazepam on visually-defined EEG patterns, *Journal of psychopharmacology* 11:367-372
- Silberstein R, Song J, Nunez P, Park W (2004) Dynamic sculpting of brain functional connectivity is correlated with performance. *Brain Topography* 16:249-254
- Simerly RB (2005) Wired on hormones: endocrine regulation of hypothalamic development. *Current opinion in neurobiology* 15:81-85

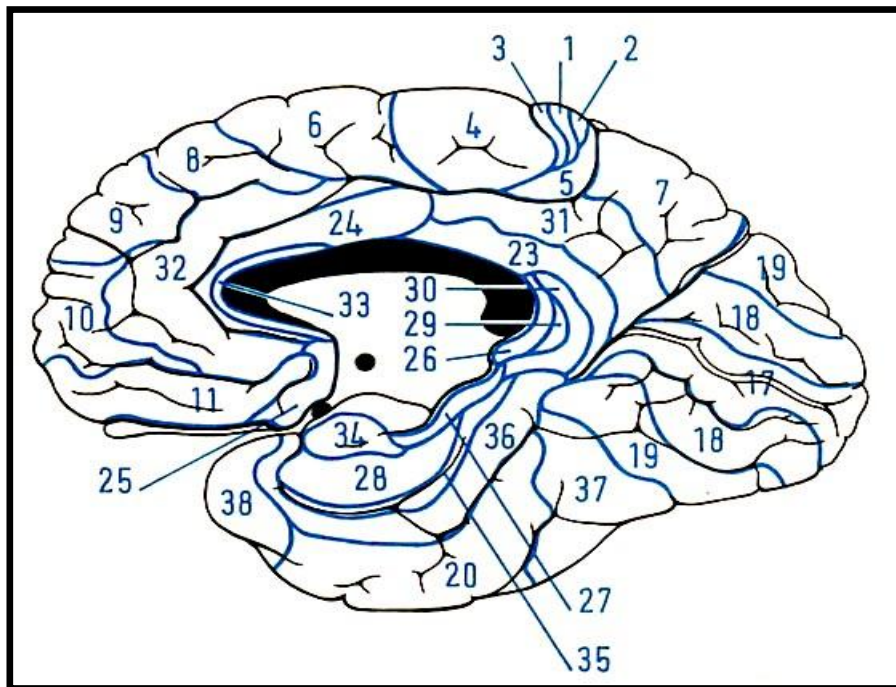
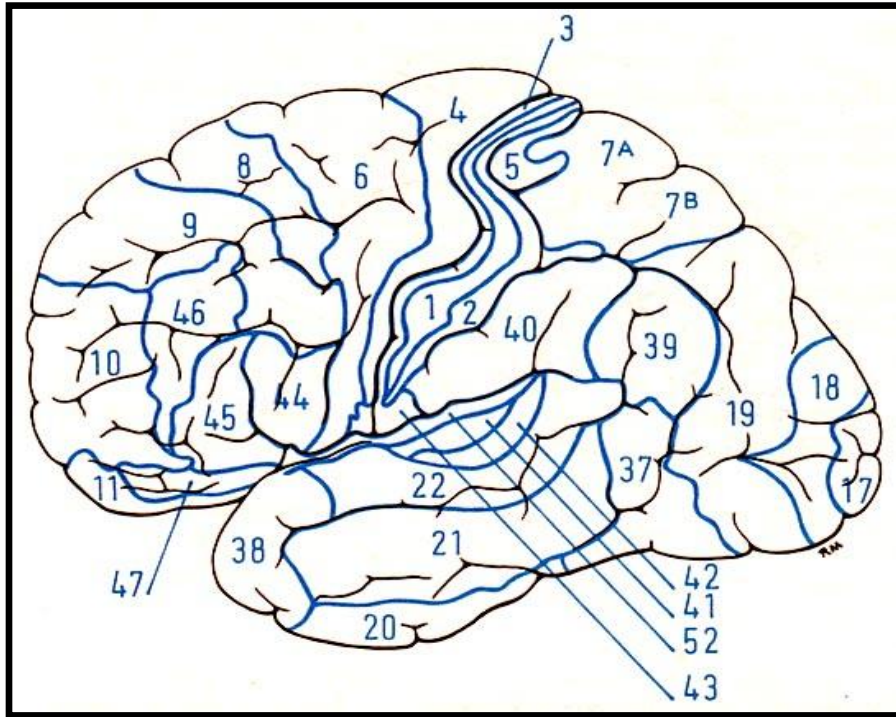
- Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology* 294:76-95
- Simmonds D, Pekar J, Mostofsky S (2008) Meta-analysis of Go/No-go tasks demonstrating that fMRI activation associated with response inhibition is task dependent. *Neuropsychologia* 46:224-232
- Singer W (1999) Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron* 24:49-65
- Sivilotti L, Nistri A (1991) GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 36:35-92
- Smith S, Gong Q, Hsu F, Markowitz R, French-Mullen J, Li X (1998a) GABA(A) receptor alpha4 subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. *Nature* 392:926-930
- Smith S, Gong Q, Li X, Moran M, Bitran D, Frye C, Hsu F (1998b) Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-One using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA_A-gated current and increases the GABA_A receptor alpha4 subunit in association with increased anxiety. *Journal of Neuroscience* 18:5275-5284
- Snyder PJ, Werth J, Giordani B, Caveney AF, Feltner D, Maruff P (2005) A method for determining the magnitude of change across different cognitive functions in clinical trials: the effects of acute administration of two different doses alprazolam. *Human psychopharmacology* 20:263-273
- Solís-Ortiz S, Corsi-Cabrera M (2002) EEG pattern of anxiety along the menstrual cycle. *Revista Mexicana de Psicología* 19:187-195
- Solis-Ortiz S, Corsi-Cabrera M (2008) Sustained attention is favored by progesterone during early luteal phase and visuo-spatial memory by estrogens during ovulatory phase in young women. *Psychoneuroendocrinology* 33:989-998.
- Solis-Ortiz S, Guevara M, Corsi-Cabrera M (2004) Performance in a test demanding prefrontal functions is favored by early luteal phase progesterone: an electroencephalographic study. *Psychoneuroendocrinology* 29:1047-1057
- Speck O, Ernst T, Braun J, Koch C, Miller E, Chang L (2000) Gender differences in the functional organization of the brain for working memory. *NeuroReport* 11:2581-2585
- Streeter CC, Ciraulo DA, Harris GJ, Kaufman MJ, Lewis RF, Knapp CM, Ciraulo AM, Maas LC, Ungeheuer M, Szulewski S, Renshaw PF (1998) Functional magnetic resonance imaging of alprazolam-induced changes in humans with familial alcoholism. *Psychiatry Research* 82:69-82
- Talairach J, Tournoux P (1988) *Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*. New York: Thieme, pp. 122
- Thorn C, Atallah H, Howe M, Graybiel A (2010) Differential dynamics of activity changes in dorsolateral and dorsomedial striatal loops during learning. *Neuron* 66:781-795
- Thummel KE, Wilkinson GR (1998) In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annual review of pharmacology and toxicology* 38:389-430
- Tobet S, Knoll JG, Hartshorn C, Aurand E, Stratton M, Kumar P, Searcy B, McClellan K (2009) Brain sex differences and hormone influences: a moving experience? *Journal of neuroendocrinology* 21:387-392
- Toni I, Ramnani N, Josephs O, Ashburner J, Passingham R (2001) Learning arbitrary visuomotor associations: Temporal dynamic of brain activity. *NeuroImage* 14:1048-1057
- Tononi G, Edelman GM (1998) Consciousness and complexity. *Science* 282:1846-1851
- Tsutsui K, Yamazaki T (1995) Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain Research* 678:1-9

- Ugalde E, del-Río-Portilla Y, Juárez J, Roldán A, Guevara MA, Corsi-Cabrera M (1998) Effect of diazepam and sex hormones on EEG of gonadectomized male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 23:701-712
- Unrug A, van Luijckelaar EL, Coles MG, Coenen AM (1997) Event-related potentials in a passive and active auditory condition: effects of diazepam and buspirone on slow wave positivity. *Biological psychology* 46:101-111
- Urata J, Uchiyama M, Iyo M, Enomoto T, Hayakawa T, Tomiyama M, Nakajima T, Sasaki H, Shirakawa S, Wada K, Fukui S, Yamadera H, Okawa M (1996) Effects of a small dose of triazolam on P300 and resting EEG. *Psychopharmacology (Berl)* 125: 179-184
- Valadez-Rodríguez J (2008) *Neuroanatomía Funcional (Manual Básico)*. México: Ediciones de Neurociencias, pp. 378
- Vallée M, Rivera JD, Koob GF, Purdy RH, Fitzgerald RL (2000) Quantification of neurosteroids in rat plasma and brain following swim stress and allopregnanolone administration using negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 287:153-166
- van Leewen T, Verbaten M, Koelega H, Slangen J, Gugten J van der, Camfferman G (1995) Effects of oxazepam on event-related brain potentials, EEG frequency bands, and vigilance performance. *Psychopharmacology (Berl)* 122:244-262
- van Nas A, Guhathakurta D, Wang SS, Yehya N, Horvath S, Zhang B, Ingram-Drake L, Chaudhuri G, Schadt EE, Drake TA (2009) Elucidating the role of gonadal hormones in sexually dimorphic gene coexpression networks. *Endocrinology* 150:1235–1249
- Veselis RA, Reinsel RA, Beattie BJ, Mawlawi OR, Feshchenko VA, DiResta GR, Larson SM, Blasberg RG (1997) Midazolam changes cerebral blood flow in discrete brain regions: an H2(15)O positron emission tomography study. *Anesthesiology* 87:1106-1117
- Vogt BA, Finch DM, Olson CR (1992) Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cerebral Cortex* 2:435-443
- Volkow ND, Wang GJ, Hitzemann R, Fowler JS, Pappas N, Lowrimore P, Burr G, Pascani K, Overall J, Wolf AP (1995) Depression of thalamic metabolism by lorazepam is associated with sleepiness. *Neuropsychopharmacology* 2:123-132
- von der Malsburg C (1999) The What and Why of Binding: The Modeler 's Perspective. *Neuron* 24:95-104
- Wang GJ, Volkow ND, Levy AV, Felder CA, Fowler JS, Pappas NR, Hitzemann RJ, Wong CT (1999) Measuring reproducibility of regional brain metabolic responses to lorazepam using statistical parametric maps. *Journal of Nuclear Medicine* 40:715-720
- Weiss E, Siedentopf CM, Hofer A, Deisenhammer EA, Hoptman MJ, Kremser C, Golaszewski S, Felber S, Fleischhacker WW, Delazer M (2003) Sex differences in brain activation pattern during a visuospatial cognitive task: a functional magnetic resonance imaging study in healthy volunteers *Neuroscience Letters* 344:169-172
- Williams CL (1986) A reevaluation of the concept of separable periods of organizational and activational actions of estrogens in development of brain and behavior. *Annals of the New York Academy of Science* 474:282–292
- Wilson CA and Davies DC (2007) The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. *Reproduction* 133:331–359
- Wisden W, Laurie D, Monyer H, Seeburg P (1992) The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain: I. *Journal of Neuroscience* 12:1040-1062

- Wolfe JM, Cave KR (1999) The psychophysical evidence for a binding problem in human vision. *Neuron* 24:11-7, 111-25
- Yonkers KA, Kando JC, Cole JO, Blumenthal S (1992) Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic medication. *The American journal of psychiatry* 149:587-595
- Zezula J, Slany A, Sieghart W (1996) Interaction of allosteric ligands with GABA_A receptors containing one, two, or three different subunits. *European Journal of Pharmacology* 301:207-214
- Zuloaga DG, Puts DA, Jordan CL, Breedlove SM (2008) The role of androgen receptors in the masculinization of brain and behavior: what we've learned from the testicular feminization mutation. *Hormones and behaviour* 53:613-626

ANEXO 1

A continuación se muestra el mapa citoarquitectónico desarrollado por Korbinian Brodmann, un médico alemán quien llevó a cabo estudios de las células que componen la corteza cerebral en diferentes mamíferos en comparación con la corteza del humano. Básicamente, el mapa consiste en la subdivisión de la corteza cerebral en áreas con una estructura celular y laminar similar. En el humano se distinguieron 47 áreas, cada una representada con un número.



Esquemas que muestran en una vista lateral (arriba) y medial (abajo) las áreas de Brodmann en la corteza del cerebro humano. Figuras tomadas de Valadez-Rodríguez (2008).

ANEXO 2

A continuación se incluye una de las publicaciones generadas durante la presente investigación, la cual se anexa por constituir un antecedente directo a los datos observados. Publicada en: *Journal of Clinical Neurophysiology*, 2011, en prensa.

DIAZEPAM-INDUCED CHANGES IN EEG OSCILLATIONS DURING PERFORMANCE OF A SUSTAINED ATTENTION TASK

Muñoz-Torres, Z., del Río-Portilla, Y., Corsi-Cabrera, M.

Laboratory of Sleep, Faculty of Psychology, Universidad Nacional Autónoma de México.

Corresponding author

María Corsi-Cabrera

Facultad de Psicología, Posgrado

Universidad Nacional Autónoma de México

Av. Universidad 3004,

Copilco-Universidad.

México, D.F. 04510

Phone: (5255)5622-2251; Fax: (5255)5622-2310

corsi@servidor.unam.mx

Acknowledgments:

Isabel Pérez-Montfort corrected the English version of the manuscript.

Zeidy Muñoz-Torres received a grant from CONACYT (199466). This work was partially financed by DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México Project: IN 214702-3.

ABSTRACT

The primary aim of the present study was to test diazepam (DZ) effect, a benzodiazepine (BDZ) usually prescribed to reduce anxiety and to induce sleep, on EEG activity while performing a visual sustained attention task (VISAT). EEG activity was recorded in a double-blind placebo experiment and pre-stimulus spectral power and inter- and intra-hemispheric temporal coupling were assessed during VISAT performance.

A single DZ doses (5 mg) was enough to increase reaction times during VISAT responses. DZ decreased pre-stimulus EEG power in the 1-6 Hz, 8-12 Hz and 19-35 Hz bands, and disrupted right intrahemispheric temporal coupling in the alpha (8-12 Hz) frequency range. The combined reduction in power and temporal coupling suggest both local and inter-regional DZ-induced disruption of neuronal synchronicity especially in the right hemisphere in agreement with the prominent attention-related networks in this hemisphere.

These data support the notion that the influence of DZ on behavior goes beyond sedative effects and can potentially compromise higher cognitive functions with negative consequences to daily life situations.

Keywords: benzodiazepine, sustained attention, EEG spectral power, EEG coherence, EEG correlation, EEG temporal coupling.

INTRODUCTION

The benzodiazepine, diazepam (DZ) is usually prescribed as an anxiolytic, however, DZ has sedative and hypnotic effects that reduce the vigilance level inducing undesired attention deficits. The attentional components reported to be affected by benzodiazepines in computer presentation tasks include selective attention (Preston et al., 1989; Mintzer and Griffiths, 1999; Coull et al., 2004; Boucart et al., 2007), attentional orienting mechanisms (Johnson et al., 1995; Carter et al., 1998), sustain and divided attention (Preston et al., 1989; Snyder et al., 2005; Hindmarch et al., 2007) and performance in tasks demanding psychomotor functions, such as digit/letter cancellation and digit symbol substitution (Lucchesi et al., 2003; Greenblatt et al., 2005), driving performance (Leufkens et al., 2007) and motor learning of a type-writing task (Cunha et al., 2006). Deleterious effects of BDZ on electrophysiological event related components indicative of decreased attention and feature analysis (van Leewen et al., 1995; Urata et al., 1996; Bauer et al., 1997; Unrug et al., 1997; Jääskeläinen et

al., 1999; Lucchesi et al., 2003) have also been reported.

The capacity to sustain attention over prolonged periods of time involves two main mechanisms, the maintenance of a basal level of vigilance on the one hand, and the participation of a cortical network consisting predominantly of the right frontal and parietal lobes (Fuster, 2003; Posner and Raichle, 1997). Vigilance level depends on the balance of inhibitory and excitatory processes at local cortical level, as well as on a complex interplay of global influences coming from brainstem, thalamo-cortical networks, posterior hypothalamus and basal forebrain that modulate synaptic activity by excitatory and inhibitory contributions (Steriade, 1998).

Benzodiazepine compounds modulate the GABA_A receptor complex, the main inhibitory neurotransmitter of the brain, increasing Cl⁻ conductance across membranes and thus, favoring inhibitory balance (Korpi et al., 2002). GABA_A receptors are widely expressed all over the brain including systems participating in global brain activation and in cortical

regions involved in the attentive process such as the frontal and parietal lobes (Abi-Dargham et al., 1994; Farabollini et al., 1996; Salmi et al., 2008), thus potentially altering vigilance level and attentive processes.

Quantitative analysis of EEG activity gives information on brain functional state and is a powerful method to determine effects of psychotropic drugs on human brain (Herrmann and Schaerer, 1990). Indeed, several studies have shown that acute administration of benzodiazepines in general, and diazepam in particular, produce a typical pharmaco-EEG profile during resting conditions related to BDZ plasma concentration characterized by an increase in beta activity and a decrease in alpha and theta activity (Ansseau et al., 1984; Greenblatt et al., 1989; 2005; Mandena et al., 1992; Urata et al., 1996; Bauer et al., 1997; Romano-Torres et al., 2002; Lucchesi et al., 2003). However, DZ effects on EEG activity during sustained attention remains unexplored. It is known that vigilance level (Lorenzo et al., 1995; Corsi-Cabrera et al., 1996; Steriade, 1998) and attention (Klimesch, 1999) engages alpha and beta brain oscillations and that

synchronized oscillations among brain sectors are important for cognitive complex functions (Petsche and Etlinger, 1998; Schack et al., 2005).

While spectral power analysis gives relevant information about the general level of energy in a particular frequency of oscillation, the analysis of synchronized oscillations among cortical regions discloses the temporal coupling among neuronal populations. DZ by modifying neuronal membrane potential through the opening of specific ion channels with specific time window modulates the temporal pattern of firing of large neuronal assemblies, thus may alter their capacity to become synchronized (Fingelkurts et al., 2004). Thus DZ effects on systems involved in sustained attention may be revealed by both changes in oscillations and changes in temporal coupling during performance of a sustained attention demanding task. Temporal coupling is understood here as the simultaneous –or nearly simultaneous– synchronization or desynchronization of ongoing activity due to diffuse inhibitory influences induced by DZ, and not as the direct transfer of information between sites, or effective connectivity, as proposed

elsewhere (Bertini et al., 2004; Massimini et al., 2005). The aim of the present study was therefore to test DZ effect on brain oscillations and temporal coupling during sustained attention. Pre-stimulus spectral power and spectral inter- and intra-hemispheric temporal coupling were assessed for one-second before stimuli during performance of the visual sustained attention task (VISAT) in a double-blind placebo experiment.

METHODS

Fifteen volunteers between 22 and 30 years of age (7 women and 8 men) undergraduate students from the university community participated in a double-blind study approved by the local ethical committee and in accordance with the Declaration of Helsinki. Subjects were right-handed as assessed by Annett's test and in good health, free of drugs or medications known to affect the central nervous system or the DZ metabolism as assessed by interview and questionnaires. All had normal or corrected to normal eyesight. Alcohol intake and sleep deprivation was avoided three days before the experiment. All participants were

informed on the experimental procedures and gave their written consent.

All subjects received in a counterbalanced manner a single oral dose of 5 mg of DZ in one session and placebo (PL) in another session, three to four weeks apart. We conducted an EEG recording during the performance of the task previously (PRE-PL or PRE-DZ) and 2 hours after the capsule administration (POST-PL or POST-DZ). The EEG and behavioral data of those four recordings is reported.

The VISAT is a task that measures sustained attention and reaction time and has been successfully used to assess sleep deprivation effects (Corsi-Cabrera et al., 1996). The test consists of 4 white squares (3.7 x 3.3 cm) missing one of its corners (Fig. 1 A), which were displayed one at a time, on a black background, in a random sequence on the center of a computer monitor positioned 80 cm from participants. The duration of each stimulus on the screen was 50 milliseconds, and interstimulus interval ranges randomly between 5 and 7 seconds. Before starting the test, one of the four possible squares was selected as a target stimulus, and it was randomly alternated with the other three non-target stimuli, the

task contained a low ratio of targets to no-targets (1:3), 96 stimuli in total. Subjects were instructed to pay attention to the monitor and to press the response key with their right-hand index finger, as quickly as possible every time that the target stimulus appears. A program triggered the capture of EEG activity 1 sec before the stimulus was displayed and computed failures to respond to the target stimuli, false responses and reaction times for correct and incorrect responses. The total duration of the test in this study, was about 10 minutes. The small variation in the duration of the test was due to the random interstimulus interval.

EEG activity was recorded at F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1 and O2 referred to ipsilateral ear lobes using a Grass model 8-20E polygraph with filters set at 1 and 35 Hz. Bipolar diagonal electro-oculogram was also recorded. Pre-stimulus (1 sec) EEG activity was digitized through an analog-to-digital converter of 12 bits resolution with a sampling rate of 512 Hz for off-line analysis using the acquisition program CAPTUSEN (Guevara et al., 2000). Ipsilateral ear lobes were chosen as reference to avoid common mode rejection of bipolar montages and the contamination of temporal coupling

between the two hemispheres by a common signal. EEG was carefully inspected and only epochs free of artifacts were accepted for further analysis. At least 15 artifact-free epochs per subject were submitted to a Fast Fourier Transform to obtain absolute power spectra (AP) for each Hz bin from 1 to 35 Hz, temporal coupling among cortical regions was assessed by crosscorrelation at 0 time-lag between pairs of derivations using the program POTENCOR (Guevara et al., 2003). Interhemispheric correlation spectra between pairs of homologous right and left derivations (F3-F4, C3-C4, P3-P4 and O1-O2) and intrahemispheric correlation between pairs of derivations of the same hemisphere (F-C, F-P, F-O, C-P, C-O and P-O) were obtained. EEG data before statistical analysis were approximated to a normal distribution by transforming AP to natural logarithms (log) and correlation values to Fisher's Z scores.

To reduce variables and obtain broad bands based on DZ-induced activity and not on *a priori* assumptions, AP log of each frequency bin from 1 to 35 Hz, derivation and condition was submitted to principal component analysis (PCA) followed by

VARIMAX rotation. This method extracts orthogonal independent factors or components, in this case, frequencies with correlated activity, and has been successfully used to obtain broad bands corresponding with physiological states (Corsi-Cabrera et al., 2000). Only components associated with eigenvalues higher than 1 were considered and factor loadings higher than 0.5 were required to include a frequency bin in a component. According to the PCA identified broad bands, AP and correlation values were averaged over frequencies included in a band. Frequencies sharing variance in two components (7, 13 and 18 Hz) were excluded from the average. AP and correlation values were then averaged for each subject over the same electrode and condition.

A series of three-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures were performed on one second Pre-stimulus EEG of every correctly detected target stimuli for each of the broad bands identified by PCA with drug (DZ and PL) as one variable, pre- and post-drug administration (PRE-PL, PRE-DZ and POST-PL, POST-DZ) as the second variable, and derivations as the third

variable. Probability level was set at $p < 0.01$, followed by post-hoc Tukey's Student-t tests. The sample size of 15 subjects yielded a statistical power of 0.854 for detecting significant Drug by PrePost interaction for alpha absolute power which is considered a reliable measure of DZ effects on EEG activity. Only significant results of the interaction (drug by PRE-POST-drug administration) will be described, because drug main effects are mixed with pre- post-drug administration and there were no drug by derivation interactions in AP or in temporal coupling. Only Pre-stimulus EEG for correctly detected target stimuli was analyzed to make sure that the subjects were paying attention the stimulus, which is not possible to know for non-response non-target stimuli.

Pre-stimulus EEG segments of non target stimuli were not analyzed based on previous results showing no significant differences between target and non-target stimuli in the VISAT task (Corsi-Cabrera et al., 1996). The EEG activity associated with errors was not analyzed due to low number of available trials.

RESULTS

Behavioral data

Performance of the VISAT task was impaired by 5 mg of DZ. The two-way ANOVAs (PRE/POST x PL/DZ) interaction showed that there were significant changes in reaction times [$F = 3.72$, $p < 0.05$, partial $\eta^2 = .30$]. A post-hoc Tukey test showed slower responses with DZ (POST-DZ) in comparison to the other three conditions: PRE-PL, POST-PL and PRE-DZ (Fig. 1).

The same analysis as for reaction times was performed for number of errors. None of the main effects or interactions reached statistical significance (all p 's $> .1$).

EEG data

Figure 2 shows the grand-average power spectra of all subjects in all derivations for placebo and diazepam, broad bands extracted by PCA averaged over all derivations, and eigenvalues and percentage of variance accounted for by each component in the inset. PCA analysis of absolute power yielded 4 components explaining 87.63 % of the total variance. The four independent broad bands identified were from 1 to 6 Hz, from 8 to 12 Hz, from 14 to 17 and from 19 to 35 Hz

corresponding to delta-theta, alpha, beta1 and beta2 activity respectively.

Absolute power

Absolute power significant changes are shown in figure 3. Drug by PRE- and POST-drug administration interactions were significant for delta-theta [$F = 19.83$, $p < 0.01$, partial $\eta^2 = .26$], alpha [$F = 30.57$, $p < 0.01$, partial $\eta^2 = .41$] and beta2 bands [$F = 11.03$, $p < 0.01$, partial $\eta^2 = .21$]. Post-hoc comparisons showed that delta-theta absolute power during the VISAT performance was significantly lower in POST-DZ than in PRE-DZ and POST-PL conditions. Absolute power of the alpha band was also decreased by POST-DZ administration as compared to PRE-DZ, PRE-PL and POST-PL condition. Absolute power of the beta2 band was lower in POST-DZ than in POST-PL, while it was higher in POST-PL than in PRE-PL or PRE-DZ administration.

There were no significant interactions between drug, PRE- POST- drug administration and derivations (all p 's $> .5$).

Temporal coupling

As it can be seen in figure 4, the temporal coupling of alpha frequencies in the right

hemisphere, was significantly higher in POST-PL than PRE-PL condition and it was not changed by DZ administration [$F = 7.73$, $p < 0.01$, partial $\eta^2 = .27$].

No significant results were found for interhemispheric correlation (all p 's $> .6$).

DISCUSSION

The aim of the study was to test the effects of DZ on behavioral and brain activity during the performance of a visual sustained attention task. The main results showed that a single dose of DZ (5 mg) compared to placebo and to PRE-DZ impaired performance on the visual sustained attention task by slowing down the response to the target stimuli. Accuracy in this task was less sensitive to this DZ dose, as has been reported in other studies with benzodiazepines (Coull et al., 1999; Pompéia et al., 2007).

There were significant effects of DZ on brain activity during performance of the sustained attention task. EEG results showed a generalized reduction of absolute power in all frequencies during active engagement in the sustained attention task. The reduction was significant for delta-

theta and alpha activity as compared to the PRE-DZ and POST-PL conditions, while beta2 absolute power remained unchanged when compared to PRE-DZ, and was significantly lower compared to POST-PL.

Behavioral responses in the visual sustained attention task indicated a slowing down of information processing under DZ, which is consistent with findings of longer latencies and lower amplitudes of event-related components associated with information processing and attention in oddball paradigms (van Leewen et al., 1995; Urata et al., 1996; Bauer et al., 1997; Unrug et al., 1997; Lucchesi et al., 2003), and check board reversal (Bauer et al., 1997). These results also agree with difficulties reported on other components of attention, such as digit cancellation and symbols substitution tasks (Lucchesi et al., 2003; Greenblatt et al., 2005).

As could be expected for an active brain, EEG activity during performance of the visual sustained attention task under DZ was different than the typical BDZ-EEG pattern usually reported for conditions of rest. Previous works assessing BDZ effects during rest have reported a decrease in the absolute power of slow frequencies (delta,

theta and alpha) and an increase of fast frequencies (beta band) (Ansseau et al., 1984; Greenblatt et al., 1989; 2005; Mandena et al., 1992; Urata et al., 1996; Bauer et al., 1997; Romano-Torres et al., 2002; Lucchesi et al., 2003). Our data show a dissociation of the DZ effects on slow and fast frequencies during cognitive processing. Active engagement in the sustained attention task neutralized the increase in beta2 activity usually seen in the BDZ-EEG at rest, though it did not affect the typical decrease in the delta-theta and alpha bands.

The present EEG results under DZ are also different than those reported during performance of the same task after sleep deprivation. After 38 hours of total sleep deprivation, the absolute power of theta and alpha activity during rest conditions is increased (Lorenzo et al., 1995), performance in the sustained attention task is also deteriorated and the slowing down of reaction times is strongly correlated to increased absolute power in theta and alpha (Corsi-Cabrera et al., 1996; Corsi-Cabrera et al., 1999). Beta activity also increases an effect that has been interpreted as reflecting an additional effort

to cope with the task (Corsi-Cabrera et al., 1996).

These two different EEG patterns, the one after sleep deprivation and the other under DZ, suggest that different mechanisms operate after sleep deprivation and under DZ. While the EEG pattern of increased theta and alpha activity after sleep deprivation is consistent with a deactivated brain involving an increased level of hyperpolarization of the thalamo-cortical network when activating influences from the brainstem and other global activating systems are reduced (Steriade et al., 1996), the decreased delta-theta and alpha activity under DZ cannot be explained by this mechanism. If only the vigilance level were affected by DZ, then an increase instead of a decrease in slow frequencies (delta-theta) and alpha activity would have been expected, as happens during sleep (Steriade et al., 1996), as well as during low vigilance states (Akerstedt et al., 1982) and after sleep deprivation (Corsi-Cabrera et al., 1996; Corsi-Cabrera et al., 1999; Lorenzo et al., 1995). However, both delta-theta and alpha activities, were also reduced by DZ.

The absence of classical EEG signs of sedation suggest that the impairment of

information processing speed and the decrease in delta-theta and alpha power is probably due to other intrinsic effects of the drug (Lucchesi et al., 2003), and that the increase in the level of vigilance (beta power) elicited by the need to cope with environmental demands when GABAergic inhibitory activity is increased by DZ does not reach the level necessary to compensate for the effects of the drug on performance.

Another possible mechanism involved in the power of brain oscillations is the crucial role played by local cortical inhibitory interneurons in synchronizing the principal neurons (reviewed by Buzsaki, 2006). Power in EEG scalp recordings depends on the mass of the neuronal population that is firing in synchrony (Nunez et al., 2001). The multiplicity of families of GABAergic interneurons innervating different parts of principal cells, and each other, results in highly complex networks in which GABA and DZ may interact and thus modify the balance between excitatory and inhibitory influences. This, in turn, may result in a lower synchrony of the principal cortical neurons and, consequently, in a reduced power of the electrical field potentials. The

decrease in delta-theta and alpha activity suggests a disruption of neuronal synchronicity.

Alpha temporal coupling in the right hemisphere was higher after PL administration during performance of the VISAT, but was not significantly modified in the left hemisphere, results that agree with evidence showing the prominent role of the right hemisphere in attention (Posner and Raichle, 1997) and the increase in temporal coupling during cognitive processing (Corsi-Cabrera et al., 1993; Petsche and Etlinger, 1998; Rappelsberger and Petsche, 1988; Schack et al., 2005). Although DZ administration did not decrease alpha temporal coupling in the right hemisphere, it did impair the increase observed in the placebo condition.

There are some limitations to this study that must be considered; namely the small number of subjects (n=15) which leaves open the possibility to commit type II errors. However, even though this limitation does not permit us to reject null hypotheses with total certainty, the strict alpha level of 0.01 gives an acceptable certainty that supports the experimental hypotheses without committing type I

errors. The results of this basic research should there for be taken as exploratory and further research is needed using a higher number of subjects in order to elucidate possible DZ effects on other EEG parameters during sustained attention.

There was an increase in beta absolute power and in right hemisphere alpha correlation after placebo administration that cannot be explained by differences in the experimental conditions which remained unchanged. Thus, it can only be attributed to either a placebo effect or to unknown sources of variation in EEG activity, which are often encountered in EEG studies (Fingelkurts et al., 2004). However, these unexplained effects were in the opposite direction to the changes induced by DZ.

The analysis of pre-stimulus EEG activity revealed that DZ modified cortical activity

by decreasing power in the 1-6 Hz, 8-12 Hz and 19-35 Hz bands, and by impairing the temporal coupling or simultaneous coherent activity of the alpha frequencies in the right hemisphere, which accords with the prominent role of these frequencies and the right hemisphere in attention. The combined reduction in power and temporal coupling suggest both local and inter-regional DZ-induced disruptions of neuronal synchronicity possibly leading to the impairment seen in sustained attention.

A single DZ dose was sufficient to produce a deleterious effect on sustained attention by increasing reaction times, a result that could have important behavioral consequences for everyday situations. The effects of larger doses of DZ and in conditions of longer periods of sustained attention remain to be investigated.

REFERENCES

- Abi-Dargham A, Laruelle M, Seibyl J, Rattner Z, Baldwin RM, Zoghbi SS, Zea-Ponce Y, Bremner JD, Hyde TM, Charney DS. SPECT measurement of benzodiazepine receptors in human brain with iodine-123-iomazenil: kinetic and equilibrium paradigms. *J Nuc Med* 1994;35:228-38.
- Akerstedt T, Torsvall L, Gillberg M. Sleepiness and shift work: Field studies. *Sleep* 1982;5: 95-106.
- Anseau M, Doumont A, Cerfontaine JL, Mantanus H, Rousseau JC, Timist-Berthier M. Self-reports of anxiety level and EEG changes after a single dose of benzodiazepines. *Neuropsychobiology* 1984;12:255-9.
- Bauer LO, Gross JB, Meyer RE, Greenblatt DJ. Chronic alcohol abuse and the acute sedative and neurophysiologic effects of midazolam. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;133:293-9.
- Bertini M, De Gennaro L, Ferrara M, Curcio G, Romei V, Fratello F, Cristiani R, Pauri F, Rossini PM. Reduction of transcallosal inhibition upon awaking from REM sleep in humans as assessed by transcranial magnetic stimulation. *Sleep* 2004;27:875-82.
- Boucart M, Waucquier N, Michael GA, Libersa C. Diazepam impairs temporal dynamic of visual attention. *Exp Clin Psychopharmacol* 2007;15:115-22.
- Buzsaki G. *Rhythms of the Brain*. New York: Oxford University Press, 2006.
- Carter CS, Maddock R, Chaderjian M, Robert P. Attentional effects of single dose triazolam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998;22:279-92.
- Corsi-Cabrera M, Arce C, Ramos J, Lorenzo I, Guevara MA. Time course of reaction time and EEG while performing a vigilante task during total sleep deprivation. *Sleep* 1996;19:563-9.
- Corsi-Cabrera M, Arce C, del Río-Portilla Y, Pérez-Garci E, Guevara MA. Amplitude reduction in visual event-related potentials as a function of sleep deprivation. *Sleep* 1999;22:181-9.
- Corsi-Cabrera M, Guevara MA, Del-Río-Portilla Y, Arce C, Villanueva-Hernández Y. EEG bands during wakefulness, slow wave and paradoxical sleep as a result of principal component analysis in man. *Sleep* 2000;2:738-44.
- Corsi-Cabrera M, Ramos J, Guevara MA, Arce C, Gutiérrez S. Gender differences in the EEG during cognitive activity. *Int J Neurosci* 1993;72:257-64.
- Coull JT, Frith CD, Dolan RJ. Dissociating neuromodulatory effects of diazepam on episodic memory encoding and executive function. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;145:213-22.
- Coull JT, Jones ME, Egan TD, Frith CD, Maze M. Attentional effects of noradrenaline vary with arousal level: selective activation of thalamic pulvinar in humans. *Neuroimage* 2004;22:315-22.
- Cunha M, Machado D, Bastos VH, Ferreira C, Cagy M, Basile L, Piedade R, Ribeiro P. Neuromodulatory effect of bromazepam on motor learning: an electroencephalographic approach. *Neurosci Lett* 2006;407:166-70.

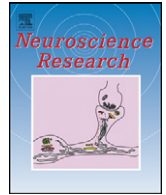
- Farabollini F, Fluck E, Albonetti E, File SE. Sex differences in benzodiazepine binding in the frontal cortex and amygdala of the rat 24 hours after restraint stress. *Neurosci Lett* 1996;218:177-80.
- Fingelkurts AA, Fingelkurts AA, Kivisaari R, Pekkonen E, Ilmoniemi RJ, Kähkönen S. Local and remote functional connectivity of neocortex under the inhibition influence. *Neuroimage* 2004;22:1390-406.
- Fuster J. *Cortex and Mind: Unifying Cognition*. New York: Oxford University Press, 2003.
- Greenblatt DJ, Ehrenberg BL, Gunderman J, Locniskar A, Scavone JM, Harmatz JS, Shader RI. Pharmacokinetic and electroencephalographic study of intravenous diazepam, midazolam and placebo. *Clin Pharmacol Ther* 1989;45:356-65.
- Greenblatt DJ, Gan L, Harmatz JS, Shader RI. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-dose triazolam: electroencephalography compared with the Digit-Symbol Substitution Test. *Br J Clin Pharmacol* 1005;60:244-8.
- Guevara MA, Ramos J, Hernández-González M, Madera-Carrillo H, Corsi-Cabrera M. CAPTUSEN: un sistema para la adquisición computarizada del EEG y los potenciales relacionados a eventos. *Revista Mexicana de Psicología* 2000;17:77-88.
- Guevara MA, Ramos J, Hernández-González M, Zarabozo D, Corsi-Cabrera M. POTENCOR: a program to calculate power and correlation spectra of EEG signals. *Comput Methods Programs Biomed* 2003;72:241-50.
- Herrmann WM, Schaerer E. Pharmacology-EEG: computer EEG analysis to describe the projection to drug effects on a functional cerebral level in humans. In: Lopes da Silva FH, Storm van Leeuwen W, Rémond, A, eds. *Clinical applications of computer analysis of EEG and other neurophysiological signals*. Amsterdam: Elsevier, 1990;385-445.
- Hindmarch I, Trick L, Ridout F. A double-blind, placebo- and positive-internal-controlled (alprazolam) investigation of the cognitive and psychomotor profile of pregabalin in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;183:133-43.
- Jääskeläinen I, Hirvonen J, Saher M, Pekkonen E, Sillanauke P, Näätänen R, Tiitinen H. Benzodiazepine temazepam suppresses the transient 40 Hz response amplitude in humans. *Neurosci Lett* 1999;268:105-7.
- Johnson DN, Weingartner HJ, Andreason P, George DT. An effect of triazolam on visual attention and information processing. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;121:145-9.
- Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Rev* 1999;29:169-95.

- Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog Neurobiol* 2002;67:113-59.
- Leufkens TR, Vermeeren A, Smink BE, van Ruitenbeek JGR. Cognitive, psychomotor and actual driving performance in healthy volunteers after immediate and extended release formulations of alprazolam 1 mg. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;191:951-9.
- Lorenzo I, Ramos J, Arce C, Guevara MA, Corsi-Cabrera M. Effect of total sleep deprivation on reaction time waking EEG activity in man. *Sleep* 1995;18:346-54.
- Lucchesi LM, Pompéia S, Manzano GM, Kohn AF, Galduroz JCF, Bueno OFA, Tufik S. Flunitrazepam-induced changes in neurophysiological, behavioural, and subjective measures used to assess sedation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:525-33.
- Mandena JW, Kuck MT, Danhof M. Differences in intrinsic efficacy of benzodiazepines are reflected in their concentration-EEG effect relationship. *Br J Pharmacol* 1992;105:162-70.
- Massimini M, Ferrarelli F, Huber R, Esser SK, Singh H, Tononi G. Breakdown of cortical effective connectivity during sleep. *Science* 2005;309:2228-32.
- Mintzer Z, Griffiths RR. Triazolam and zolpidem: effects on human memory and attentional processes. *Psychopharmacol (Berl)* 1999;144:8-19.
- Nunez PL, Wingeier BM, Silberstein RB. Spatial-temporal structures of human alpha rhythms: theory, microcurrent sources, multiscale measurements and global binding of local networks. *Hum Brain Mapp* 2001;13:125-64.
- Petsche H, Etlinger SC. *EEG and thinking: power and coherence analysis of cognitive processes*. Vienna: Austrian Academy of Sciences, 1998.
- Posner MI, Raichle ME. *Images of Mind*. New York: Freeman, 1997.
- Preston GC, Ward CE, Broks P, Traub M, Stahl SM. Effects of lorazepam on memory, attention and sedation in man: antagonism by Ro 15-1788. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;97:222-7.
- Rappelsberger P, Petsche H. Probability mapping: power and coherence analyses of cognitive processes. *Brain Topogr* 1988;1:46-54.
- Romano-Torres M, Borja-Lascurain E, Chao-Rebolledo C, del Río-Portilla Y, Corsi-Cabrera M. Effects of diazepam on EEG power and coherent activity: sex differences. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27:821-33.
- Salmi E, Aalto S, Hirvonen J, Långsjö JW, Maksimow AT, Oikonen V, Metsähonkala L, Virkkala J, Någren K, Scheinin H. Measurement of GABAA receptor binding in vivo with [11C]flumazenil: a test-retest study in healthy subjects. *Neuroimage* 2008;41:260-9.
- Schack B, Klimesch W, Sauseneg P. Phase synchronization between theta and upper alpha oscillations in a working

- memory task. *Int J Psychophysiol* 2005;57:105-14.
- Snyder PJ, Werth J, Giordani B, Caveney AF, Feltner D, Maruff P. A method for determining the magnitude of change across different cognitive functions in clinical trials: the effects of acute administration of two different doses alprazolam. *Hum Psychopharmacol* 2005;20:263-73.
- Steriade M, Amzica F, Contreras D. Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous cortical rhythms during brain activation. *J Neurosci* 1996;16:392-417.
- Steriade M. Cellular substrates of brain rhythms. In: Niedermeyer E, Lopes da Silva F, eds. *Electroencephalography: Basic principles, clinical applications, and related fields*. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1998;28-75.
- Unrug A, van Luijtelaa ELJM, Coles MGH, Coenen AML. Event-related potentials in a passive and active auditory condition: effects of diazepam and buspirone on slow wave positivity. *Biol Psychol* 1997;46:101-11.
- Urata J, Uchiyama M, Iyo M, Enomoto T, Hayakawa T, Tomiyama M, Nakajima T, Sasaki H, Shirakawa S, Wada K, Fukui S, Yamadera H, Okawa M. Effects of a small dose of triazolam on P300 and resting EEG. *Psychopharmacology (Berl)* 1996;125:179-84.
- Van Leewen TH, Verbaten MN, Koelega HS, Kenemans JL, Slangen JL. Effects of bromazepam on single-trial event-related potentials in a visual vigilance task. *Psychopharmacol (Berl)* 1992;106:555-64.

ANEXO 3

A continuación se presenta la publicación principal generada durante la presente investigación, la cual se anexa por complementar de manera central los datos presentados en este manuscrito. Publicada en: Neuroscience Research (2011) 70, 3:260-268.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21458503>



Behavioural and neural effects of diazepam on a rule-guided response selection task

Z. Muñoz-Torres^a, J.L. Armony^{a,b}, D. Trejo-Martínez^c, R. Conde^c, M. Corsi-Cabrera^{a,*}

^a *Laboratory of Sleep, Facultad de Psicología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3004, Mexico City 04510, Mexico*

^b *Department of Psychiatry and Douglas Mental Health University Institute, McGill University, Montreal, Canada*

^c *Department of Magnetic Resonance, Hospital Ángeles del Pedregal, Mexico City, Mexico*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2010

Received in revised form 6 March 2011

Accepted 20 March 2011

Available online 31 March 2011

Keywords:

Benzodiazepine

Diazepam

fMRI

Rule guided behaviour

Cognition

Drug

Human

ABSTRACT

Diazepam (DZ), a clinically important drug, reduces alertness and can interfere with complex cognitive processes. The effect of DZ on the behavioural and neural correlates of rule-guided response selection has not been directly investigated.

We studied DZ effects, compared to placebo (PL), on performance and brain responses, using fMRI, during rule implementation, when arbitrary stimulus-specific rules were involved.

BOLD activity was measured in eighteen healthy volunteers during rule-guided response selection with DZ or PL administered in two counterbalanced sessions.

A 10 mg dose of DZ was sufficient to increase reaction times and to reduce accuracy in a rule-guided task but not in a motor task containing the same stimuli. With PL, implementing arbitrary rules activated right anterior cingulate/middle frontal gyri. Under DZ more brain areas were recruited during the task compared to PL, especially occipito-parietal cortices, as well as the left temporal lobe. For the congruent trials rules, more activity was observed in the right retrosplenial cortex when participants had taken DZ.

These findings indicate that DZ might disrupt the neural activity necessary to implement novel rules, supporting the notion that DZ influence on behaviour goes beyond perceptual and motor processes that can potentially compromise complex cognitive functions.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

1. Introduction

Every day life confronts us with the need to select rapid responses between alternative, contextually appropriate choices, based on the combination of several, potentially inconsistent sensory cues and abstract rules. For example, we need to stop the car on a green traffic light if a person is crossing the street. The adjustment of the usual course of action to the new circumstances require more than just passive sensory processing, it demands an active conscious supervision of the actual context and thus require the participation of higher-order cognitive systems (Fuster, 2008). Several neuroimaging studies in humans have identified an extensive and widespread network involved in flexible rule-guided behaviour, with the prefrontal cortex playing a general role in rule representation and other areas activated depending on the type of rule being represented (Bunge et al., 2003; Christoff et al., 2009), such as occipito-temporal areas for visual categorization (Tanaka, 2003), medial temporal lobe for memory (O'Neil et al., 2009), parietal lobe for visuo-spatial processing (Corbetta and Shulman, 2002)

and frontoparietal communication for selecting sensory stimuli derived from internal goals (Corbetta et al., 2000).

Diazepam (DZ), a benzodiazepine (BDZ) derivative drug, is usually prescribed to reduce anxiety. DZ facilitates the action of GABA, the main inhibitory neurotransmitter in the adult mammalian brain, by enhancing chloride influx through the GABA_A receptor complex (Mohler and Okada, 1977; Squires and Braestrup, 1977). In addition to its anxiolytic action, DZ has sedative and hypnotic effects that reduce the vigilance level which can lead to undesired side-effects, including drowsiness, performance deficits in vigilance tasks, reduced psychomotor activity and attention, as well as anterograde amnesia (for reviews see Curran, 1991; Woods et al., 1992; Nutt and Malizia, 2001; Buffett-Jerrott and Stewart, 2002). Indeed, several studies have shown that benzodiazepines in general, and diazepam in particular, can affect performance and brain activity in a variety of tasks, ranging from those demanding low cognitive processes such as finger tapping (Curran et al., 1998; Mintzer et al., 2001) and saccadic eye movements (Masson et al., 2000), to others involving higher cognitive load, such as discrimination reaction time (Berchou and Block, 1983), digit substitution (Curran et al., 1998; Mintzer et al., 2001), digit cancellation (Curran et al., 1998; Fluck et al., 2001), attention (Coull et al., 1995; Fluck et al., 2001), memory (Curran et al., 1998; Coull et al., 1999; Mintzer

* Corresponding author. Tel.: +56 22 22 51; fax: +56 22 23 10.
E-mail address: corsi@servidor.unam.mx (M. Corsi-Cabrera).

and Griffiths, 1999), planning (Coull et al., 1999; Deakin et al., 2004) and deductive reasoning (Pompéia et al., 2007).

Critically, the effects of DZ, at behavioural and neural levels, during a rapid response selection task based on abstract rules have not been explored. Given that DZ receptors are distributed throughout the brain (Abi-Dargham et al., 1995; Millet et al., 2006) including cortical areas participating in flexible behaviour according to abstract rules, such as lateral prefrontal, anterior cingulate, posterior temporal and parietal cortices (Bunge et al., 2003, 2005; Christoff et al., 2009), and that inhibitory effects on brain metabolic activity in several of these regions have been reported during resting conditions (Veselis et al., 1997; Reinsel et al., 2000), we hypothesized that DZ would impair rapid response selection based on abstract rules.

In the present study, we investigated the effects, using functional magnetic resonance imaging (fMRI), of an acute single dose of 10 mg of DZ on the ability to select a response between alternative options in a rule-guided task containing arbitrary rules based on the combination of visual stimuli. Specifically, the task required the selection of appropriate and fast responses to compound stimuli according to rules which arbitrarily followed or contradicted the usual meaning of the information conveyed by the individual stimuli. To do so, we conducted a repeated-measures experiment in which the subjects were administered DZ or placebo (PL) in a counterbalanced manner prior to performing the rule-guided task in the scanner. We hypothesized that DZ-enhanced inhibition would affect neural processing of the stimulus-rule association, particularly at the prefrontal cortex, resulting in an impairment in performance.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Twenty healthy volunteers (10 men) participated in this study. Subjects ranged in age from 21 to 35 years (mean = 25.5) and had a body mass index of $23.4 \pm 2.9 \text{ kg/m}^2$ (mean \pm SD). Subjects reported having completed 14–21 (mean = 16.6) years of education. None of them had a history of head trauma or surgery, mental illness or drug addiction, and were free of medications known to affect the central nervous system or the DZ metabolism as determined by medical history and personal interview. Subjects began to refrain from taking alcohol or any medication 72 h before the recording sessions. All subjects were right-handed as assessed by Annett's test (1967). The study was approved by the Faculty of Medicine Ethics Committee of the National Autonomous University of Mexico and informed consent was obtained from all participants prior to the study.

Subjects ingested one of two similarly looking capsules containing either 10 mg of DZ or PL in a repeated measures counterbalanced design. Subjects were blind to the contents of the capsule. Scanning was performed between 2 and 5 h after the capsule intake, in a period when the DZ distribution has been reported as stable (Friedman et al., 1985). All participants underwent two experimental sessions separated by 3–5 weeks. Women were scanned during the early follicular phase (between 3rd and 5th day of hormonal cycle) to avoid potential confounding effects due to the interaction between DZ and sex hormones (Romano-Torres et al., 2002). Progesterone and estrogen levels were assessed and only women that presented plasma levels corresponding to the early follicular phase were included (estradiol 41.2 mcg/ml (SD 36.3); progesterone 1.33 mcg/ml (SD 3.2)).

Arterial blood samples were obtained just before or after fMRI scanning (counterbalanced) to determine DZ concentration by high performance liquid chromatography. Participants were conducted to their homes at the end of the sessions.

Data from two subjects (one man and one woman) were removed from the analyses due to technical problems with the stimulus presentation device.

2.2. Cognitive task

During scanning, subjects performed a reaction-time rule-guided task, based on stimulus-dependent complex arbitrary rules. The task required subjects to select between two alternative responses, to press a key once (single click) or twice (double click) with the right index finger as fast as possible, depending on a set of arbitrary rules. Following a preparatory screen with a central fixation point and two lateral squares, a white arrow appeared at the center of the screen for 500 ms, which could point to either side, immediately followed by the target (a red or green cross), which appeared in one of the squares for 100 ms. Thus, there were four different stimuli, which, critically, were unequal in their congruency with expected prepotent responses. Specifically, responses to the target when the arrow was pointing towards its location should be facilitated compared to when they were pointing away from it ("Posner effect") and responses to a green target should be faster than to a red one, based on the usual meaning of green ("go") and red ("stop") signals. Therefore, the *arrow towards green cross* (fully congruent: CC) was congruent in both dimensions, the *arrow towards red cross* (color incongruent: CI) and *arrow away from green cross* (direction incongruent: DI) were incongruent in one dimension (cross color and arrow direction, respectively), and the *arrow away from red cross* (fully incongruent: II) was incongruent in both dimensions. The fully congruent and incongruent stimuli required a double click whereas the partly incongruent one required a single click (see Fig. 1b).

Stimuli were presented in a pseudo-random order with the constraint that no more than three stimuli of the same type appeared consecutively. Four blocks of 40 stimuli were presented (10 of each of the four rules). Four additional "catch trials", in which no target followed the arrow and no response was required, were also presented in order to achieve a stochastic distribution of stimulus onset asynchrony and to provide an interstimulus baseline. An interval of 4000 ms separated the trials (see Fig. 1a). Responses were recorded with an MR-compatible mouse. The task was run inside the scanner with E-Prime (Psychology Software Tools, Pittsburgh, Pennsylvania).

Subjects received the instructions and practiced the task outside the scanner before each fMRI session to avoid possible long term memory effects and to ensure the instruction for each rule was correctly understood. The practice test consisted in one block with 20 stimuli, 5 of each rule type; subjects performed the practice test until they got more than three correct responses of each rule type. Only 3 of the 18 subjects needed a second block to achieve this criterion.

In order to assess the DZ effects over general motor output, subjects performed a motor control task, containing exactly the same stimuli as in the cognitive task previously described, but were required to respond with a double click as fast as possible anytime the target (cross) appeared, independently of its color and location relative to the arrow.

The motor and cognitive tasks used here were previously tested in an independent, larger sample of subjects ($N=39$). Results demonstrated significantly slower reaction times (RTs) for the cognitive task in comparison to the motor task and faster RTs for the fully congruent stimulus compared to the others, with no differences among those that had at least one incongruent component. Based on these findings (confirmed here; see Section 3), we divided the stimuli into *congruent* (or "easy") and *incongruent* (or "difficult") for the fMRI analysis.

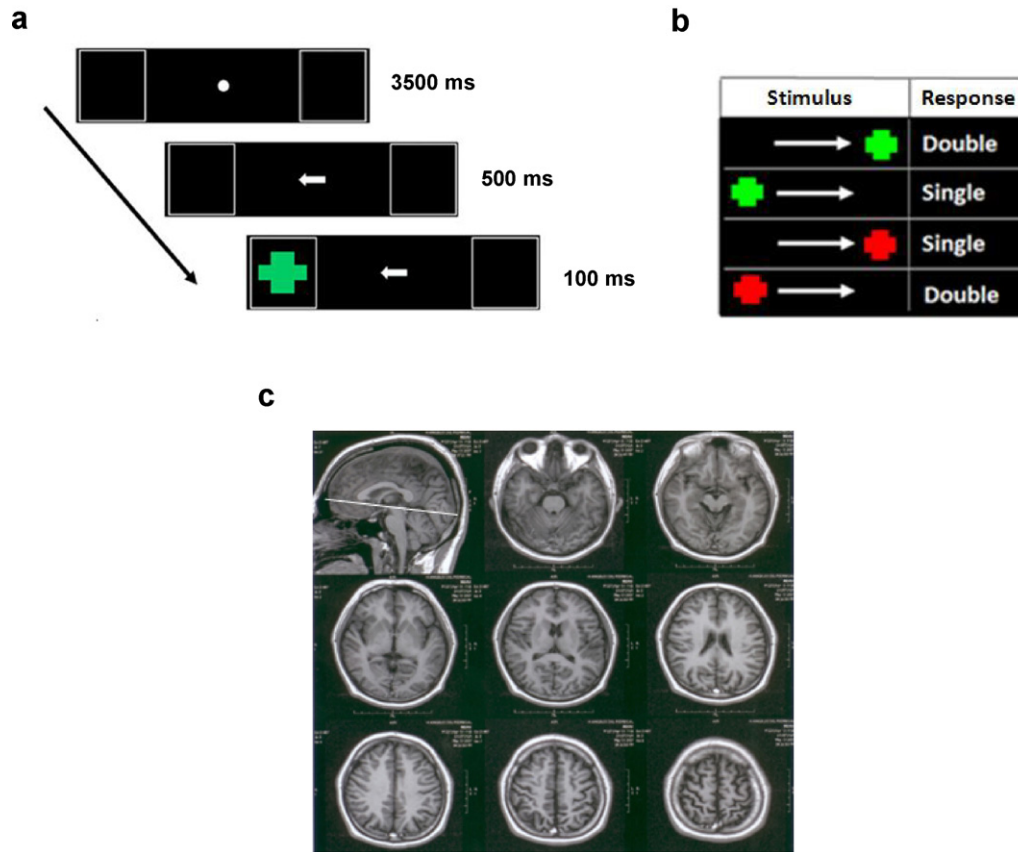


Fig. 1. (a) Schematic of a trial, (b) illustration of the stimuli and the required response (for the black and white version: the two first stimuli correspond to the green cross and the last two to the red cross) and (c) the bicomisural line in a sagittal view and the 8 axial slices acquired.

2.3. MRI acquisition

Functional MRI data was acquired with a General Electric 1.5 Tesla MR system at the *Hospital Angeles del Pedregal*. For each subject and each session, 240 echo-planar image volumes were acquired (8 6-mm-thick axial slices; TR = 3 s; TE = 27 ms; interslice gap: 4 mm; FOV: 24 cm × 24 cm, matrix: 128 × 128), in four runs of 60 scans with three dummy scans discarded before analysis due to T1 saturation effects. Before the functional runs, a T1-weighted anatomical scan was obtained (TR = 18.4 ms, TE = 4.2 ms, 0.47 mm × 0.47 mm × 3 mm voxel size). The 8 slices were set over regions of interest (Fig. 1c). The third slice was positioned parallel to the anterior-posterior commissure line with 2 slices below and 3 slices above. The lowest slice included the basal region of orbitofrontal cortex, mesencephalon, superior region of cerebellum (culmen) and visual cortex. The uppermost slice included the superior frontal gyrus, pre and postcentral gyri and superior parietal lobe.

2.4. Data analysis

2.4.1. Behavioural data

Performance data (reaction times and correct responses) were subjected to a three-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with two levels of task (cognitive, motor), two levels of drug (PL, DZ) and four stimuli. Further post hoc Duncan analyses were conducted when appropriate to better identify the source of the observed statistically significant difference between conditions. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for statistical comparisons. Reaction times for double click responses were computed for the first click registered.

2.4.2. fMRI data

Functional data was preprocessed following standard procedures using SPM2 (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm2). Briefly, functional images for each subject were realigned to the first image of each session to correct for head movement between scans and corrected for differences in slice acquisition times. Images were then spatially normalized to a standard space (Talairach and Tournoux, 1988) using the MNI template (Evans et al., 1994). Finally, images were spatially smoothed using an isotropic Gaussian kernel of 8 mm FWHM.

There were 5 trial types (the four stimuli and the catch trial). Events were modeled as events coinciding with the presentation of the target, convolved with the synthetic hemodynamic response function.

Brain responses associated with each experimental condition were estimated according to the general lineal model for an event-related design at each voxel (Friston et al., 1995). In order to identify the brain regions associated with the performance of the rule-guided task and to compare our results with previous reports of functional brain imaging during rule-guided behaviour, we first analyzed cerebral activity under normal (placebo) conditions. Two contrasts were computed for each subject: (1) a contrast of overall response selection for the four rules versus non-response (catch) trials; and (2) a contrast comparing the *incongruent* trials with the *congruent* one. In order to balance the contrasts in which 3 conditions were compared to one condition we multiply the congruent condition by three. These contrasts were taken to a second-level (random-effects) one-sample *t*-test. Statistical maps were thresholded at $p < 0.001$ uncorrected for multiple comparisons, with a cluster-level threshold of $p < 0.05$.

To assess the influence of DZ on brain activity as a function of the rule-guided task, paired *t*-tests were conducted comparing the contrasts defined above between the DZ and PL conditions.

3. Results

The mean plasma level of Diazepam measured was 170 (SD 55.7) mcg/ml, which is within the ranges of a clinically effective dose.

3.1. Behavioural results

3.1.1. Reaction times

Mean reaction times as a function of the experimental variables, namely task, drug and stimulus, are shown in Fig. 2a. A nested repeated-measures ANOVA was conducted to analyze potential differences in these responses. Main effects of task and drug were statistically significant: subjects were slower during the cognitive (experimental) than the motor (control) task ($p < 0.0001$) and they performed more slowly while under DZ compared to PL ($p < 0.0001$). Critically, a significant drug-by-task interaction was observed ($p < 0.0001$), such that the slowing-down effect of the drug on reaction times was only present during the cognitive task (post hoc $p < 0.01$), with no difference for the motor task (post hoc $p > 0.2$).

In addition, there was a trend for a main effect of stimuli ($p = 0.06$) together with a significant task-by-stimulus interaction ($p < 0.03$), due to slower reaction times for the *incongruent* trials compared to the *congruent* one only during the cognitive task (post hoc $p < 0.01$). The drug by stimulus interaction did not reach significance level ($p = 0.1$).

Reaction times within session split in early and late stage showed no differences between stages ($p = 0.91$) neither interactions with diazepam ($p = 0.8$) nor with stimuli ($p = 0.7$).

Although there was a session effect ($p < 0.001$), due to overall shorter reaction times in the second than in the first session, no interaction with drug or stimulus type was observed ($p = 0.9$).

3.1.2. Accuracy

The same analysis as for reaction times was performed for accuracy (percent of correct responses). The main effect of task was statistically significant ($p < 0.0001$) with more correct responses on the motor than on the cognitive task (Fig. 2b). The main effect of drug was also statistically significant ($p < 0.001$); subjects committed more errors under DZ compared to PL.

As with reaction times, there was a trend for a main effect of stimulus ($p = 0.06$), together with a significant task-by-stimulus interaction ($p < 0.03$). Post hoc comparisons revealed that significantly ($p < 0.01$) more errors were committed for the fully incongruent trial compared to the fully congruent, only during the cognitive task. Finally, a significant drug-by-task interaction was observed ($p < 0.0006$) such that more correct responses were observed on motor than on cognitive task with PL and DZ, however DZ effects on the cognitive task was reflected with more errors committed in comparison to PL.

3.2. fMRI

3.2.1. Rule-guided task under placebo

Fig. 3a and Table 1 show the significant activations for the contrast of the overall response selection (the four stimuli) minus the non-response/catch trials under PL. Response selection according to abstract rules produced activation of the left middle frontal gyrus (Brodmann Area (BA) 46); right cingulate gyrus (BA 24, 32), superior region of the right parietal lobe (BA 7) including the precuneus bilaterally (BA 19 and 7), the left inferior parietal region (BA 40), the right lingual gyrus (BA 18) and the cerebellum bilaterally.

The contrast between *incongruent* versus the *congruent*, easy stimulus showed that incongruent, more difficult stimuli resulted in increased activation in the anterior region of the right cingulate gyrus (BA 32)/middle frontal gyrus (BA 9), while no significant decrease activation associated with these stimuli was observed (Fig. 3b and Table 1).

3.2.2. Diazepam effects

Significant activations associated with response selection (the four stimuli) versus non-response/catch trials under DZ, in comparison to PL, were found in the inferior (BA 40) and superior (BA 7) region of the right parietal lobe, the right precuneus (BA 7), posterior regions in the right temporal lobe such as fusiform gyrus, inferior temporal gyrus (BA 20) and superior temporal gyrus (BA 22 and 38); regions within the left temporal as the parahippocampal gyrus (BA 34 and 36), uncus (BA 28) and middle temporal gyrus (BA 37). Other activations were found in left claustrum/insula and putamen bilaterally, in the right occipital lobe the inferior (BA 18 and 19) and middle occipital gyri (BA 18) (Fig. 4a and Table 2).

No areas showed stronger activation for PL than DZ at our pre-established statistical threshold (see Section 2). However, because a reduction in BOLD activity due to the DZ inhibitory influence was expected, an exploratory analysis was conducted with a lower threshold ($p < 0.01$ uncorrected). Decreased activations were then observed with DZ in the inferior (BA 9), medial (BA 10) and superior (BA 9) of the right frontal lobe, left inferior frontal gyrus (BA 45), right precentral gyrus (BA 6), left insula (BA 13) right anterior cingulate gyrus (BA 24), and bilateral inferior parietal lobe (BA 40) including the left supramarginal gyrus (Fig. 5 and Table 3).

A paired *t*-test between PL and DZ for the *incongruent* versus *congruent* trials contrast revealed significant differences in the retrosplenial cortex of the right hemisphere. Post hoc analyses of the parameter estimates for activation clusters corresponding to the different conditions (Fig. 4b and Table 2) revealed that activity was larger for DZ compared to PL during the *congruent* trials.

4. Discussion

The goal of this study was to assess the behavioural and neural effects of a single dose of diazepam in healthy subjects on the ability to select responses guided by arbitrary rules. Reaction time results showed that a single dose of DZ (10 mg) – a level similar to that commonly prescribed for anxiety treatment –, compared to placebo, impaired performance on a rule-guided task, slowing down the selection of the pertinent response according to abstract rules. Furthermore, accuracy was impaired with this DZ dose. Importantly, the effect of DZ on reaction times could not be explained by alterations in the motor component of the response, as no differences between PL and DZ were observed in a motor control task employing the exact same stimuli. Although results across sessions with longer reaction times in the first session than in the second was consistent with a possible learning effect of the task, no interactions with drug were observed, suggesting that the effects of DZ on this task were not mediated by impairments in learning or long-term memory processes. Further studies are needed to unveil the specific cognitive processes affected by GABAergic drugs, as well as to discern the cognitive strategies employed by the subjects during rule implementation, when arbitrary stimulus-specific rules are involved.

The rule-guided task under placebo activated prefrontal association regions including the middle frontal gyrus and the dorsal region of the anterior cingulate cortex, as well as the parietal association area. Activation of these regions is consistent with previous studies showing that tasks demanding higher-order cognitive functions, such as rule-guided behaviour, involve the participation of

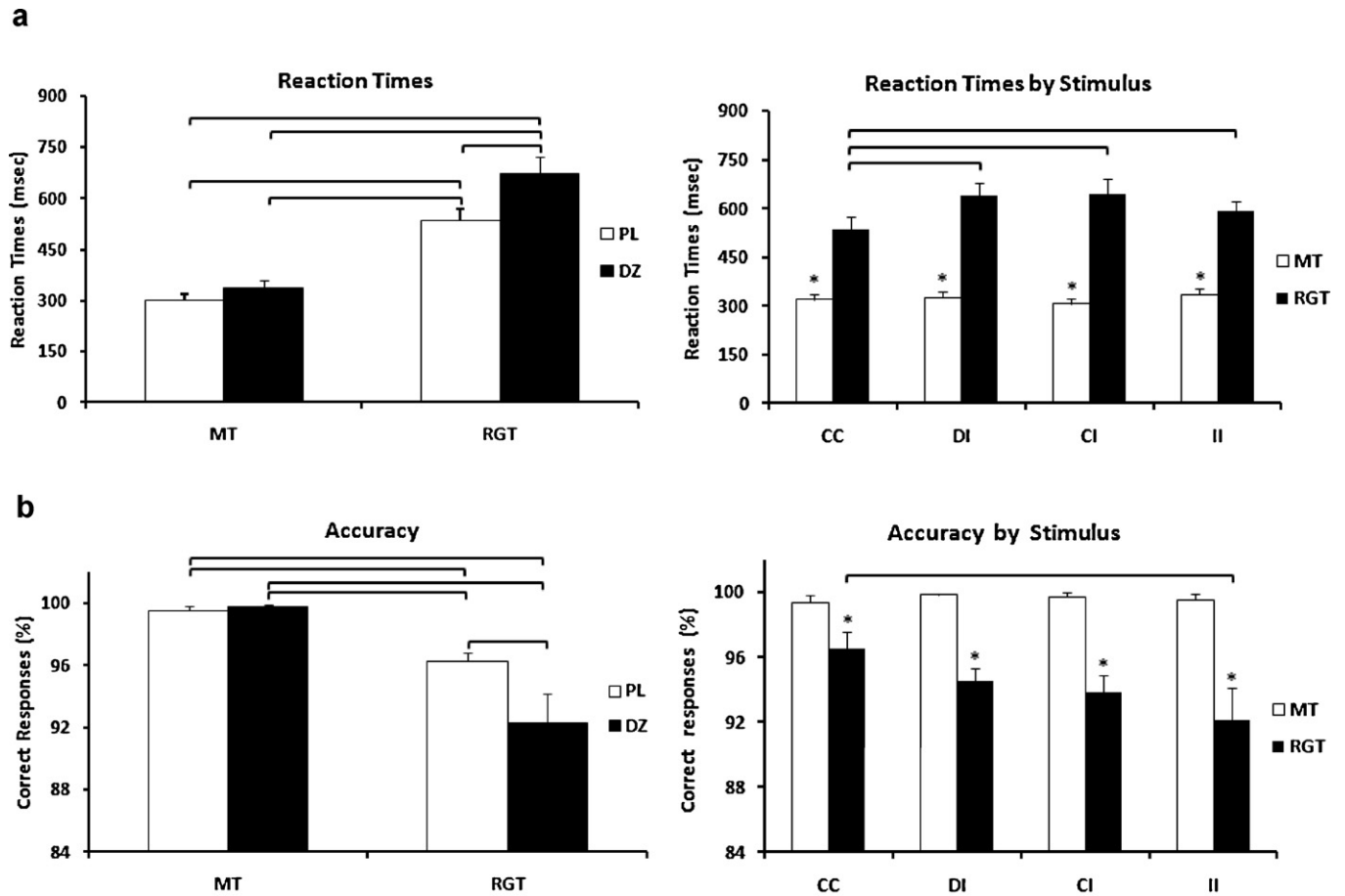


Fig. 2. Significant effects obtained in the analysis of the behavioural data. (a) *Left*: mean and standard errors of reaction times in ms for the motor (MT) and rule-guided (RGT) tasks as a function of drug (left) and stimulus (right); (b) Correct responses for the motor (MT) and rule-guided (RGT) tasks as a function of drug (left) and stimulus (right). Brackets indicate statistical differences ($p < 0.05$) between two conditions. Asterisks show differences for the motor task and the corresponding condition in the rule-guided task ($p < 0.05$).

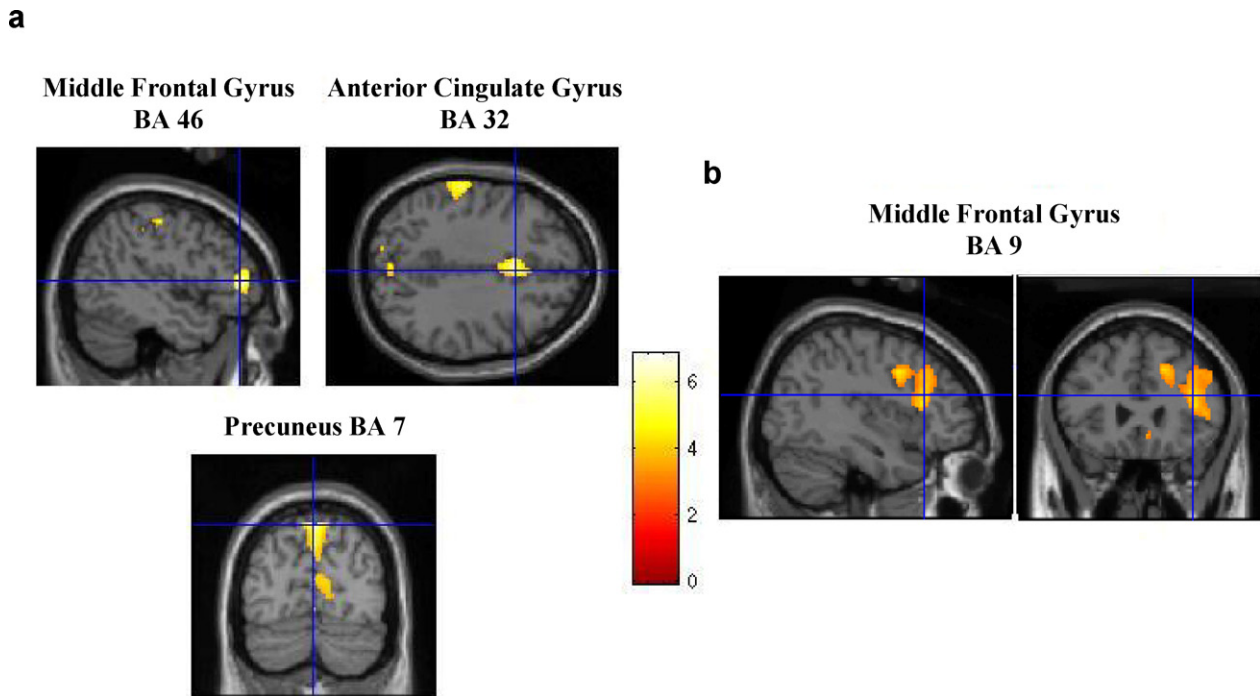


Fig. 3. Statistical maps for the placebo condition (a) showing the contrast between response selection (all stimuli) minus non-response/catch trials, (b) contrast between incongruent (DI, CI, II) versus congruent (CC) trials. Scale represents the significance level for activations. Representative areas are shown. See Table 1 for all significant activations.

Table 1

Regions of BOLD activity in the placebo condition for the following contrasts: response selection minus non-response and congruent versus incongruent trials.

Voxel Z score	Coordinates			Regions activated	Brodmann area	Cluster size
	x	y	z			
<i>Decision > Non-decision</i>						
4.54	-46	40	6	Left	Middle frontal gyrus	BA 46
4.53	6	-68	0	Right	Lingual gyrus	BA 18
4.28	0	-58	-6	Left	Cerebellum	-
3.76	14	-58	-16	Right	Cerebellum	-
4.25	0	-76	56	Left	Precuneus	BA 7
4.18	2	-78	40	Right	Precuneus	-
3.92	-10	-84	42	Left	Precuneus	BA 19
4.16	-62	-24	32	Left	Inferior parietal lobule	BA 40
4.15	2	14	36	Right	Cingulate gyrus	BA 32
4.05	-6	-4	52	Left	Medial frontal gyrus	BA 6
3.53	2	-10	40	Right	Cingulate gyrus	BA 24
3.86	-2	-98	-4	Left	Lingual gyrus	BA 18
<i>Incongruent > Congruent</i>						
4.52	20	16	36	Right	Cingulate/middle frontal	BA 32/9
<i>Congruent > Incongruent</i>						
-	-	-	-	-	-	-

prefrontal dorsolateral areas (Stuss and Knight, 2002), the anterior cingulate gyrus – involved in conflict situations and performance monitoring – (Botvinick, 2007), and the parietal lobe – involved in attentional process – (Petersen et al., 1994; Corbetta and Shulman, 2002). Activation in posterior regions was also observed, in the right superior parietal cortex, expanding it to the precuneus, as well as visual regions, consistent with the visuo-spatial nature of the stimuli (Petersen et al., 1994), and cerebellum, possibly related to the motor and non-motor associative components of the task (Bellebaum and Daum, 2011).

Under placebo, the anterior region of cingulate gyrus and middle frontal gyrus were more active during *incongruent* trials than during the *congruent* ones, in agreement with previous studies showing that tasks demanding higher-order cognitive functions, such as rule-guided behaviour, involve the participation of prefrontal dor-

solateral areas (Stuss and Knight, 2002) and the anterior cingulate gyrus – involved in conflict situations and performance monitoring – (Botvinick, 2007). These areas appeared in the right hemisphere, which has previously been associated with the processing of novel cognitive situations (Goldberg et al., 1994).

Contrary to our hypothesis, we did not observe a significant decrease in activation under DZ, compared to PL. Instead, new regions were recruited under DZ, suggesting possible compensatory mechanisms engaged to accurately perform the rule-guided task. This new network included several regions of the temporal lobe, such as the parahippocampal gyrus, which are traditionally associated with memory processes (O'Neil et al., 2009). The detrimental effects of BDZ on memory tasks have been well established (Curran et al., 1998; Mintzer and Griffiths, 1999). As these areas were not significantly active in the PL condition, it is likely

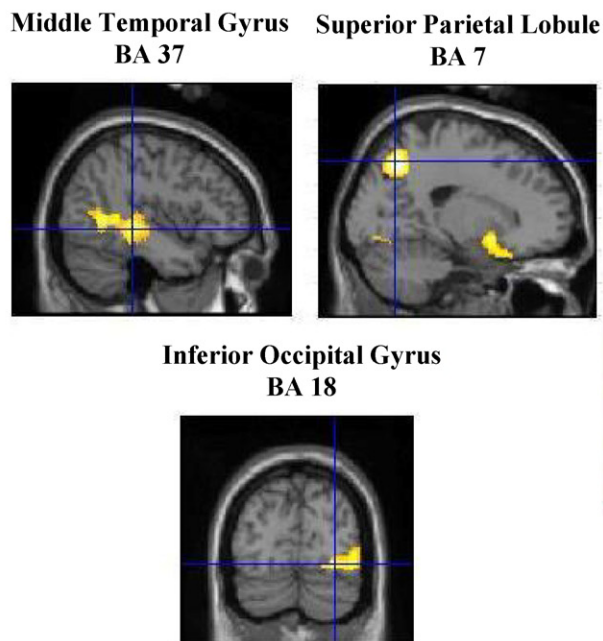
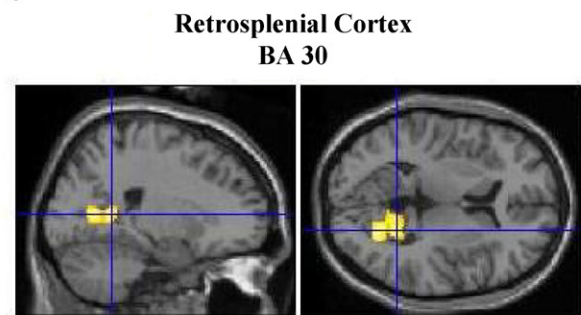
a**b**

Fig. 4. Statistical maps showing some of the regions significantly more active with diazepam than placebo for (a) the contrast of response selection (all stimuli) minus non-response/catch trials, (b) significant interaction between drug (DZ/PL) and trial type (congruent/incongruent). A list of all significant activations for this contrast is reported in Table 2. Scale represents the significance level for activations.

Table 2
Regions of BOLD activity increment with diazepam in comparison to placebo during response selection minus non-response and congruent versus incongruent trials.

Voxel Z score	Coordinates			Regions activated	Brodmann area	Cluster size
	x	y	z			
<i>Decision > Non-decision DZ > PL</i>						
3.84	20	-66	48	Right	Precuneus	BA 7
3.46	34	-46	58	Right	Superior parietal lobule	
3.15	34	-52	46	Right	Inferior parietal lobule	BA 40
3.69	-48	-54	0	Left	Middle temporal gyrus	BA 37
3.36	-42	-32	-6	Left	Parahippocampal gyrus	BA 36
3.65	24	10	-10	Right	Putamen	-
3.04	10	10	-22	Right	Rectal gyrus	BA 11
2.98	30	22	-28	Right	Superior temporal gyrus	BA 38
3.61	-36	6	-4	Left	Clastrum/insula	-
3.41	-24	10	-2	Left	Putamen	-
3.44	-16	4	-26	Left	Uncus	BA 28
3.27	-10	-2	-18	Left	Parahippocampal gyrus	BA 34
3.21	46	-78	-6	Right	Inferior occipital gyrus	BA 19
3.14	30	-80	-8	Right	Middle occipital gyrus	BA 18
2.98	40	-84	-2	Right	Inferior occipital gyrus	
2.98	54	-10	-8	Right	Superior temporal gyrus	BA 22
2.58	46	-14	-24	Right	Fusiform gyrus	BA 20
2.47	52	-10	-20	Right	Inferior temporal gyrus	
<i>Incongruent > Congruent</i>						
-	-	-	-	-	-	-
<i>Congruent > Incongruent</i>						
4.71	28	-66	10	Right	Retrosplenial Cortex	BA 30

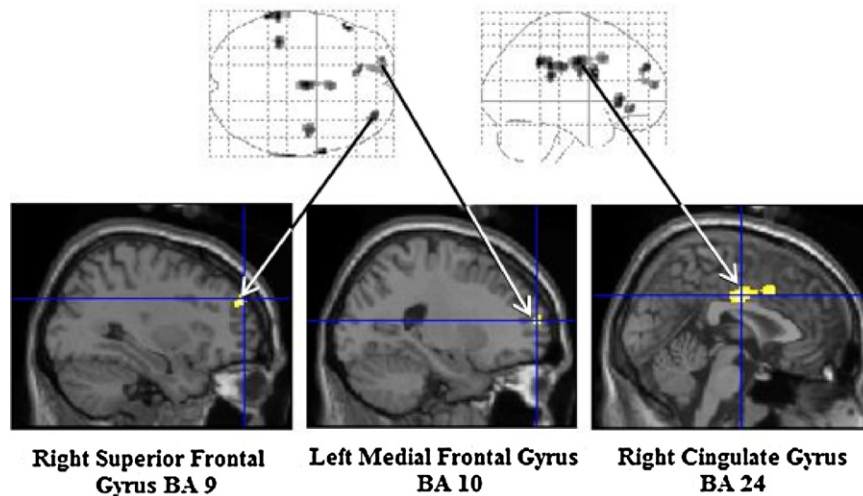


Fig. 5. Statistical map showing regions with an activity reduction in the diazepam condition in comparison to placebo for the contrast of response selection (all stimuli) minus non-response/catch trials. For this contrast the threshold was lowered to $p=0.01$. The coordinates for these activations are reported in Table 3.

Table 3
Regions that showed a reduction of BOLD activity with diazepam in comparison to placebo during response selection minus non-response. Only for this contrast the threshold was lowered as an exploratory analysis ($p < 0.01$).

Voxel Z score	Coordinates			Regions activated	Brodmann area	Cluster size
	x	y	z			
<i>Decision > Non-decision PL > DZ</i>						
2.67	-62	-46	36	Left	Supramarginal gyrus	BA 40
2.62	-62	-36	34	Left	Inferior parietal lobule	
2.66	64	6	24	Right	Inferior frontal gyrus	BA 9
2.62	2	-10	36	Right	Cingulate gyrus	BA 24
2.5	-52	30	2	Left	Inferior frontal gyrus	BA 45
2.46	-38	-34	24	Left	Insula	BA 13
2.44	68	-26	32	Right	Inferior parietal lobule	BA 40
2.38	32	54	32	Right	Superior frontal gyrus	BA 9
2.32	44	-8	30	Right	Precentral gyrus	BA 6
2.25	-10	38	-8	Left	Medial frontal gyrus	BA 10

that additional, memory-related processes were needed to perform the task under DZ. Although the rule-guided task employed here was not a long-term memory task, since the task was practiced before scanning, subjects did have to keep in memory the arbitrary rules in order to correctly respond during task performance. The posterior area of the left temporal lobe also showed an activity increase under DZ. This is a polymodal association area receiving processed information from the inferior parietal lobule, and reciprocally connected with prefrontal areas (Petrides and Pandya, 2002), which has been implicated in the storage of rule meaning (Bunge, 2004; Donohue et al., 2005) and is activated when instructional cues associated with specific rules are observed (Bunge et al., 2003). Significant activation was also found in regions important for high-order cognitive process such as the temporo-parietal junction (Corbetta and Shulman, 2002), the insula/claustrum (Huettel and McCarthy, 2004) and the superior parietal lobe (Petersen et al., 1994; Corbetta and Shulman, 2002). More extensive areas involved in the processing of the visual properties of the stimuli were also activated.

Under DZ, compared to PL, increased activity for *congruent* stimuli was observed in the retrosplenial cortex of the right hemisphere, probably related to the retrieval of information stored in long-term memory (Krause et al., 1999).

A reduction in the BOLD activity was expected as consequence of the inhibitory influence of DZ, especially in prefrontal cortex, a region associated with the inhibition of habitual behaviour, but this did not occur unless the probability threshold was lowered substantially ($p < 0.01$). Future research is needed, using different doses, to further explore this issue. However, similar lack of deactivation have been shown in other studies with PET (Mintzer et al., 2001), suggesting that the cognitive demands of the task may be sufficient to revert the reduction in activity reported during rest with BDZ (Veselis et al., 1997; Reinsel et al., 2000).

Alternatively, the increase in BOLD activity seen in cortical regions under DZ during the rule-guided task could be the result of the enhanced fast oscillatory activity reported under BDZ in resting conditions during wakefulness (Romano-Torres et al., 2002; Jensen et al., 2005; Hall et al., 2010) and even during sleep (Aeschbach et al., 1994).

Another possible cellular event occurring with DZ administration is that inhibitory interneurons are inhibited disrupting the balance between inhibition of principal neurons and areas that normally are in silence now turn active, interfering with the appropriate information processing. The metabolic increase is also consistent with the no task-related increased metabolic activity with BDZ in the temporal lobe reported during rest conditions (Wang et al., 1999) and in occipito-parietal regions during REM sleep (Finelli et al., 2000), and support the evidence that the DZ impact on brain activity is selective to some regions rather than having global effects. However, further research is needed using increasing DZ doses to better elucidate the changes in susceptibility of different brain areas to DZ under external cognitive demands.

The sample of the present study included equal numbers of men and women. Because of the relatively small sample size, we were not able to investigate potential sex differences in the behavioural and neural effects of DZ. This is an important issue, given the interactions between sex hormones and GABA_A receptors (Majewska et al., 1986; Smith et al., 2007), and should be addressed in future studies, as well as other possible factors, such as personality, which may affect the response to DZ in a cognitive task.

Another limitation of the present study that needs to be considered is the small number of slices acquired during fMRI scanning, due to technical reasons, reducing the spatial resolution of the observed activations. Nonetheless, we ensured that cov-

erage included cortical and subcortical regions relevant for the task.

5. Conclusion

The present findings indicate that a single dose of DZ disrupts the behavioural and neural activity, resulting in a negative impact on response selection ability based on abstract rules, especially when novel arbitrary rules are involved. Successful performance in such a task under DZ therefore appears to demand the participation of additional brain areas. Taken together, these observations contribute to the growing notion (Coull et al., 1999; Deakin et al., 2004) that the influence of benzodiazepines goes beyond global sedative and motor effects and that, instead, it has selective detrimental effects on complex tasks requiring rapid response selection, particularly when this requires the integration of different sources of information needed to implement abstract rules in order to determine the appropriate response.

Acknowledgements

This work was supported by CONACYT, Project: 50709. Muñoz-Torres Z received a grant from CONACYT: 199466. This work constitutes part of an academic thesis of the Biomedical Science Ph.D. program at UNAM. We thank Dr. Julián A. Sánchez Cortázar of Aceleración Nuclear y Resonancia Magnética S.A. de C.V.; Dr. Bernardo Ronzón Fernández and QFB Alma Delia Guerrero Huesca of Laboratorio y Banco de Sangre, at Hospital Ángeles del Pedregal for fMRI and blood analyses facilities.

References

- Abi-Dargham, A., Gandelman, M., Zoghbi, S.S., Laruelle, M., Baldwin, R.M., Randall, P., Zea-Ponce, Y., Charney, D.S., Hoffer, P.B., Innis, R.B., 1995. Reproducibility of SPECT measurement of benzodiazepine receptors in human brain with iodine-123-iomazenil. *J. Nucl. Med.* 36, 167–175.
- Aeschbach, D., Cajochen, C., Tobler, I., Dijk, D.J., Borbély, A.A., 1994. Sleep in a sitting position: effect of triazolam on sleep stages and EEG power spectra. *Psychopharmacology (Berl.)* 114, 209–214.
- Annett, M., 1967. The binomial distribution of right, mixed and left handedness. *Q. J. Exp. Psychol.* 19, 327–333.
- Bellebaum, C., Daum, I., 2011. Mechanisms of cerebellar involvement in associative learning. *Cortex* 47, 128–136.
- Berchou, R., Block, R.L., 1983. Use of computerized psychomotor testing in determining CNS effects of drugs. *Percept. Motor Skills* 57, 691–700.
- Botvinick, M.M., 2007. Conflict monitoring and decision making: reconciling two perspectives on anterior cingulate function. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 7, 356–366.
- Buffett-Jerrott, S.E., Stewart, S.H., 2002. Cognitive and sedative effects of benzodiazepine use. *Curr. Pharm. Des.* 8, 45–58.
- Bunge, S.A., 2004. How we use rules to select actions: a review of evidence from cognitive neuroscience. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 4, 564–579.
- Bunge, S.A., Kahn, I., Wallis, J.D., Miller, E.K., Wagner, A.D., 2003. Neural circuits subserving the retrieval and maintenance of abstract rules. *J. Neurophysiol.* 90, 3419–3428.
- Bunge, S.A., Wallis, J.D., Parker, A., Brass, M., Crone, E.A., Hoshi, E., Sakai, K., 2005. Neural circuitry underlying rule use in humans and nonhuman primates. *J. Neurosci.* 25, 10347–10350.
- Christoff, K., Keramatian, K., Gordon, A.M., Smith, R., Mädler, B., 2009. Prefrontal organization of cognitive control according to levels of abstraction. *Brain Res.* 1286, 94–105.
- Corbetta, M., Kincade, J.M., Ollinger, J.M., McAvoy, M.P., Shulman, G.L., 2000. Voluntary orienting is dissociated from target detection in human posterior parietal cortex. *Nat. Neurosci.* 3, 292–297.
- Corbetta, M., Shulman, G.L., 2002. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 201–215.
- Coull, J.T., Frith, C.D., Dolan, R.J., 1999. Dissociating neuromodulatory effects of diazepam on episodic memory encoding and executive function. *Psychopharmacology (Berl.)* 145, 213–222.
- Coull, J.T., Sahakian, B.J., Middleton, H.C., Young, A.H., Park, S.B., McShane, R.H., Cowen, P.J., Robbins, T.W., 1995. Differential effects of clonidine, haloperidol, diazepam and tryptophan depletion on focused attention and attentional search. *Psychopharmacology (Berl.)* 121, 222–230.
- Curran, H.V., 1991. Benzodiazepines, memory, and mood: a review. *Psychopharmacology (Berl.)* 105, 1–8.

- Curran, H.V., Pooviboonsuk, P., Dalton, J.A., Lader, M.H., 1998. Differentiating the effects of centrally acting drugs on arousal and memory: an event-related potential study of scopolamine, lorazepam and diphenhydramine. *Psychopharmacology (Berl.)* 135, 27–36.
- Deakin, J.B., Aitken, M.R., Dowson, J.H., Robbins, T.W., Sahakian, B.J., 2004. Diazepam produces disinhibitory cognitive effects in male volunteers. *Psychopharmacology (Berl.)* 173, 88–97.
- Donohue, S.E., Wendelken, C., Crone, E.A., Bunge, S.A., 2005. Retrieving rules for behaviour from long-term memory. *Neuroimage* 26, 1140–1149.
- Evans, A.C., Kamber, M., Collins, D.L., Macdonald, D., 1994. An MRI-based probabilistic atlas of neuroanatomy. In: Shorvon, S., Fish, D., Andermann, F., Bydder, G.M., Stefan, H. (Eds.), *Magnetic Resonance Scanning and Epilepsy*. Plenum, New York, pp. 263–274.
- Finelli, L.A., Landolt, H.P., Buck, A., Roth, C., Berthold, T., Borbély, A.A., Achermann, P., 2000. Functional neuroanatomy of human sleep states after zolpidem and placebo: a H215O-PET study. *J. Sleep Res.* 9, 161–173.
- Fluck, E., Fernandes, C., File, S.E., 2001. Are lorazepam-induced deficits in attention similar to those resulting from aging? *J. Clin. Psychopharmacol.* 21, 126–130.
- Friedman, H., Ochs, H.R., Greenblatt, D.J., Shader, R.I., 1985. Tissue distribution of diazepam and its metabolite desmethyldiazepam: a human autopsy study. *J. Clin. Pharmacol.* 25, 613–615.
- Friston, K.J., Holmes, A.P., Worsley, K.J., Poline, J.B., Frith, C., Frackowiak, R.S.J., 1995. Statistical parametric maps in functional imaging: a general linear approach. *Hum. Brain Mapp.* 2, 189–210.
- Fuster, J., 2008. *The Prefrontal Cortex*. Elsevier, USA, pp. 424.
- Goldberg, E., Podell, K., Lovell, M., 1994. Lateralization of frontal lobe functions and cognitive novelty. *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.* 6, 371–378.
- Hall, S.D., Barnes, G.R., Furlong, P.L., Seri, S., Hillebrand, A., 2010. Neuronal network pharmacodynamics of GABAergic modulation in the human cortex determined using pharmacomagnetoencephalography. *Hum. Brain Mapp.* 31, 581–594.
- Huetzel, S.A., McCarthy, G., 2004. What is odd in the oddball task? Prefrontal cortex is activated by dynamic changes in response strategy. *Neuropsychologia* 42, 379–386.
- Jensen, O., Goel, P., Kopell, N., Pohja, M., Hari, R., Ermentrout, B., 2005. On the human sensorimotor-cortex beta rhythm: sources and modeling. *Neuroimage* 26, 347–355.
- Krause, B.J., Horwitz, B., Taylor, J.G., Schmidt, D., Mottaghy, F.M., Herzog, H., Halsband, U., Müller-Gärtner, H., 1999. Network analysis in episodic encoding and retrieval of word-pair associates: a PET study. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3293–3301.
- Majewska, M.D., Harrison, N.L., Schwartz, R.D., Barker, J.L., Paul, S.M., 1986. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004–1007.
- Masson, G.S., Mestre, D.R., Martineau, F., Soubrouillard, C., Brefel, C., Rascol, O., Blin, O., 2000. Lorazepam-induced modifications of saccadic and smooth-pursuit eye movements in humans: attentional and motor factors. *Behav. Brain Res.* 108, 169–180.
- Millet, P., Graf, C., Moulin, M., Ibáñez, V., 2006. SPECT quantification of benzodiazepine receptor concentration using a dual-ligand approach. *J. Nucl. Med.* 47, 783–792.
- Mintzer, M.Z., Griffiths, R.R., 1999. Selective effects of zolpidem on human memory functions. *J. Psychopharmacol.* 13, 18–31.
- Mintzer, M.Z., Griffiths, R.R., Contoreggi, C., Kimes, A.S., London, E.D., Ernst, M., 2001. Effects of triazolam on brain activity during episodic memory encoding: a PET study. *Neuropsychopharmacology* 25, 744–756.
- Mohler, H., Okada, T., 1977. Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 198, 849–851.
- Nutt, D.J., Malizia, A.L., 2001. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br. J. Psychiatry* 179, 390–396.
- O'Neil, E.B., Cate, A.D., Köhler, S., 2009. Perirhinal cortex contributes to accuracy in recognition memory and perceptual discriminations. *J. Neurosci.* 29, 8329–8334.
- Petersen, S.E., Corbetta, M., Miezin, F.M., Shulman, G.L., 1994. PET studies of parietal involvement in spatial attention: comparison of different task types. *Can. J. Exp. Psychol.* 48, 319–338.
- Petrides, M., Pandya, D., 2002. Association pathways of the prefrontal cortex and functional observations. In: Stuss, D., Knight, R. (Eds.), *Principles of Frontal Lobe Function*. Oxford University Press, USA, pp. 31–50.
- Pompéia, S., Manzano, G.M., Pradella-Hallinan, M., Bueno, O.F., 2007. Effects of lorazepam on deductive reasoning. *Psychopharmacology (Berl.)* 194, 527–536.
- Reinsel, R.A., Veselis, R.A., Dnistrian, A.M., Feshchenko, V.A., Beattie, B.J., Duff, M.R., 2000. Midazolam decreases cerebral blood flow in the left prefrontal cortex in a dose-dependent fashion. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 3 (2), 117–127.
- Romano-Torres, M., Borja-Lascurain, E., Chao-Rebolledo, C., del-Río-Portilla, Y., Corsi-Cabrera, M., 2002. Effect of diazepam on EEG power and coherent activity: sex differences. *Psychoneuroendocrinology* 27, 821–233.
- Smith, S.S., Shen, H., Gong, Q.H., Zhou, X., 2007. Neurosteroid regulation of GABA(A) receptors: focus on the alpha4 and delta subunits. *Pharmacol. Ther.* 116, 58–76.
- Squires, R.F., Braestrup, C., 1977. Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266, 732–734.
- Stuss, D., Knight, R., 2002. *Principles of Frontal Lobe Function*. Oxford University Press, USA, pp. 640.
- Talairach, J., Tournoux, P., 1988. *Co-planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain: 3-Dimensional Proportional System: An Approach to Cerebral Imaging*. Thieme, New York, pp. 122.
- Tanaka, K., 2003. Columns for complex visual object features in the inferotemporal cortex: clustering of cells with similar but slightly different stimulus selectivities. *Cereb. Cortex* 13, 90–99.
- Veselis, R.A., Reinsel, R.A., Beattie, B.J., Mawlawi, O.R., Feshchenko, V.A., DiResta, G.R., Larson, S.M., Blasberg, R.G., 1997. Midazolam changes cerebral blood flow in discrete brain regions: an H2(15)O positron emission tomography study. *Anesthesiology* 87, 1106–1117.
- Wang, G.J., Volkow, N.D., Levy, A.V., Felder, C.A., Fowler, J.S., Pappas, N.R., Hitzemann, R.J., Wong, C.T., 1999. Measuring reproducibility of regional brain metabolic responses to lorazepam using statistical parametric maps. *J. Nucl. Med.* 40, 715–720.
- Woods, J.H., Katz, J.L., Winger, G., 1992. Benzodiazepines: use, abuse, and consequences. *Pharmacol. Rev.* 44, 151–347.

Glossary

- BA: Brodmann area
 BDZ: Benzodiazepines
 DZ: Diazepam
 fMRI: functional magnetic resonance imaging
 FOV: Field of view
 FWHM: Full width at half maximum
 PL: Placebo
 TE: Echo time
 TR: Repetition time