

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

“ESTUDIO CONDUCTUAL EN TORNO AL POSIBLE PAPEL DE LOS  
RECEPTORES GABA<sub>C</sub> AMIGDALINOS EN LA MODULACIÓN DE LA  
ANSIEDAD EN LA RATA.”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA  
PRESENTA:  
AVRIL JANNETTE NUCHE BRICAIRE

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Miguel A. Pérez de la Mora

REVISOR DE TESIS: Dr. Antonio P. Zainos Rosales

SINODALES:

Mtro. Alfonso Salgado Benitez

Dr. José Luis Diaz Meza

Dr. César Casasola Castro

MÉXICO D.F., 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

AGRADECEMOS EL APOYO AL INSTITUTO DE  
FISIOLOGÍA CELULAR, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS,  
Y A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS  
DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA )  
DE LA UNAM DONATIVO IN-200508,  
ASÍ COMO EL APOYO TÉCNICO BRINDADO  
POR LA Q.F.B. MINERVA CRESPO RAMÍREZ  
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

A mi abuela,  
Te extraño María.

¡Madre mía!, este esfuerzo no sólo es  
gracias a tí, es tan tuyo como mío,  
porque lo sufriste conmigo  
y sé que ahora lo disfrutas tanto como yo.  
Jamás podré agradecerte suficiente por darle  
a mí vida esa hermosa mezcla de fortaleza,  
inteligencia y buen humor , te adoro.

Pa, sé que nos costó trabajo estar cerca,  
pero aprecio que nunca hayas dejado de intentarlo,  
gracias por todo el apoyo,  
sobretudo en los momentos difíciles,  
por la confianza que tienes en lo que puedo y hago,  
ahora nos toca celebrar éste, nuestro pequeño  
gran triunfo, ¡y aún nos faltan muchos más!.

Doña Mary, Don Ray,  
Me hubiera gustado tanto que estuvieran aquí,  
pero sé que están felices y orgullosos,  
gracias por cuidarme y quererme tanto,  
tantísimo, incluso ahora,  
gracias por los recuerdos y las enseñanzas,  
fueron grandes, son inolvidables.

Paco, a tí te debo haber volteado  
al horizonte, jamás sería quien soy ahora  
sí no te hubieras aparecido.  
Gracias por atreverte a compartir el mismo cielo,  
por aprender a volar junto conmigo.

A la familia Oviedo Medina  
Por que jamás podría olvidar el gran apoyo  
y el cariño. Por que siempre me hicieron  
sentir como parte de ella, gracias.

## **A mis Hermanos** (estricto orden de aparición):

**Mirtha**, mi Yang, gracias por soportarme y acompañarme siempre, por quererme tanto, por enseñarme tanto, te admiro por tu fuerza, por tu inmensa capacidad de amar, de dar, te quiero mucho.

**Gabacha**, siempre serás mi hermana, no importa que tan desconectados anden nuestros cerebros, gracias por estar.

**Mayito**, sólo gracias por estos 13 años, por la compañía y la confianza, por que siempre hay una palabra de aliento en el momento justo para mí, por que además no sé como lo haces, pero siempre es la correcta.

**Edgar**, lo más gracioso de todo es que entre más lejos más cerca, gracias por todo, de verdad te quiero.

**Adrián**, desde mí....hasta tí, nunca lo olvido, nunca lo olvidés.

## **A mis Amigas** (estricto orden alfabético): **Gaby, Kika, Marcía, Neyra, Olínka, Rebeca, Vero.**

Porque nos hemos ganado esa A, porque es una bendición de la vida tenerlas a mi lado. Gracias.

**Neyra y Olínka**, gracias por el apoyo en el diseño editorial, no les debo una, les debo varias.

## **A mis amigos de la "fac"** (estricto orden cronológico):

**Master**, un poquito de ella también es tuyo, por todo el estrés que te tocó por contagio. Tú también haz labrado un lugar en mis amígdalas, y no sólo por el alboroto auditivo compartido, sino por ser y confiar en que puedes ser conmigo.

**Chínix**, gracias por todos estos años, por enseñarme tanto, por la confianza concedida, te admiro mucho, no sólo por tu inteligencia y por tu ñoñes contagiosa, sí no por tu fuerza y entereza, por tu congruencia con la vida. P.d. mis prefrontales también te dan las gracias por tantos años de terapia gratuita, han crecido gracias a tí.

**Juanga**, personajes como tu ¡pocos!, tienes un gran cerebro, no te nos pierdas en el camino.

**Pavel**, eres un gran amigo, gracias por considerarme y cuidarme como parte de tu "banda", sé lo que eso vale, por eso lo aprecio tanto. Y gracias por las discusiones que siempre terminaban en "safarrancho", seguro nunca encontraré a nadie con quien pelearme como contigo, te extraño.

A los cuatro gracias por ese gran equipo de trabajo, por las sociedades y las complicidades, por el aguante, el apoyo y la amistad, por los años que vienen.

**A en konstrucción**, por la dejar de creer en las utopías, y ponerse a trabajar, por dejar claro que lo único intolerable es no hacer nada.

**Al Doc Miguel**, no sólo por todo el trabajo y el tiempo para éste trabajo, sino por la atención, el cariño y el respeto que siempre me demostró. Gracias por las enseñanzas que me llevo, que son muchas.

**A los Morítas:**

**Mine**, gracias, por que gran parte de todo éste trabajo es tuyo y por enseñarme cada parte de él.

**Naty**, gracias por siempre estar ahí para nosotros, no sólo en el trabajo, sino siempre, haces de ese laboratorio una familia, las quiero mucho (A las tres).

**Candy, Dany, Josué, Isuí** gracias por todo el apoyo, por ayudarme a cada paso, por la amistad, la compañía, y los buenos momentos, los voy a extrañar mucho. **I suí**, gracias también por todo el trabajo que aportaste para los cortes y tinciones, te la debo.

**Yex, Andrea**, ¡por fin!, ahora les toca a ustedes, y se que harán un gran trabajo, a las dos muchas gracias por que siempre estaban ahí para echarme la mano, por el apoyo, por escucharme y comprenderme siempre.

**Nadía, Edick**, gracias, porque no podríamos tener mejores "roomies", los quiero.

**Al Doc Luis Igartua y a Gaby Castillo** por que la psicofisiología no fue lo mismo desde que ustedes me la enseñaron.

**A Toño Zainos, al Profe Salgado, a César Casasola y a José Luis Díaz**, por el interés en mi trabajo y el apoyo para lograrlo. No pude haber tenido mejor jurado,  
GRACIAS.

## **INDICE GENERAL**

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES	
2.1 ANSIEDAD.....	6
2.1.1 Aspectos clínicos de la ansiedad.....	7
2.1.2 Aspectos biológicos de la ansiedad.....	10
2.2 SISTEMA AMIGDALINO.....	11
2.2.1 Filogenia y ontogenia.....	14
2.2.2 Anatomía.....	16
2.2.3 Conexiones, vías de entrada y de salida.....	18
2.2.4 Las islas de células intercaladas (ITC) como una interfase entre el BLA y el CeA.....	20
2.3 LOS RECEPTORES GABAÉRGICOS C	
2.3.1 El GABA y su importancia en la ansiedad.....	25
2.3.2 Diferencias y semejanzas entre los receptores GABAérgicos.....	27
2.3.3 Agonistas y Antagonistas.....	29
2.3.4 Moduladores del Receptor GABA <sub>C</sub> .....	31
2.3.5 Localización y Función del Receptor GABA <sub>C</sub> en el SNC.....	35
2.4 LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE “+”.....	39
3. MÉTODO	
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	43
3.2 HIPÓTESIS.....	43
3.3 OBJETIVOS.....	44

3.4 VARIABLES.....	44
3.5	DISEÑO
EXPERIMENTAL.....	44
3.6 CONTEXTO Y ESCENARIOS.....	45
3.7 CIRUGÍA.....	46
3.8 APARATOS	
3.8.1 Laberinto elevado en forma de “+”.....	46
3.8.2 Campo abierto.....	46
3.9 PROCEDIMIENTO.....	48
3.10 EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA.....	49
3.11 ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1 HISTOLOGÍA.....	51
4.2 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN BILATERAL INTRAMIGDALINA DE TPMPA Y BICUCULINA SOBRE EL NIVEL DE EXCITABILIDAD.....	55
4.3 RESULTADOS DE LA MICROINYECCIÓN DE TPMPA.....	55
4.4 RESULTADOS DE LA MICROINYECCIÓN DE BICUCULINA.....	60
5. DISCUSIÓN.....	65
6. CONCLUSIONES.....	72
7. REFERENCIAS.....	73
INDICE DE ABREVIATURAS.....	81

## **RESUMEN**

Es comúnmente aceptado que en los mamíferos, los receptores GABA<sub>A</sub> juegan un papel preponderante en la modulación de la ansiedad y que en ésta, la amígdala tiene una participación fundamental. En el presente trabajo se exploró la posibilidad de que los receptores GABA<sub>C</sub>, que comparten algunas características estructurales y funcionales con los receptores GABA<sub>A</sub>, pudieran también estar involucrados en la modulación de la ansiedad. Para ello, se estudiaron los efectos de la inyección bilateral intra-amigdalina del ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-il) metilfosfínico (TPMPA), un antagonista selectivo de los receptores GABA<sub>C</sub>, sobre los niveles de ansiedad en las ratas utilizando para ello el paradigma experimental de Laberinto Elevado en Forma de “signo de más” (+) y comparándolos con los efectos de un antagonista selectivo para los receptores GABA<sub>A</sub>, el alcaloide Bicuculina. Los resultados de este trabajo sugieren la existencia de receptores GABA<sub>C</sub> en la amígdala de la rata e indican que pudieran estar involucrados en la modulación de la ansiedad por parte de la amígdala. Nuestros hallazgos, también sugieren que los receptores GABA<sub>C</sub> bloqueados por el TPMPA, pudieran estar presentes en sitios anatómicos diferentes a los que poseen receptores GABA<sub>A</sub>. Finalmente, se sugiere que el TPMPA ejerce sus efectos modulatorios sobre la ansiedad alterando el flujo de impulsos nerviosos entre el núcleo basolateral y el central de la amígdala.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El receptor GABA<sub>C</sub>, es un miembro de la familia de los receptores-canal activados por ligando que ha sido muy poco estudiado en otras zonas además de la retina de las aves y mamíferos (Chebib, 2004), sobre todo en cuanto a su participación sobre la conducta. Dentro de los tipos de receptores GABAérgicos existen otros receptores como los GABA<sub>A</sub> de quien se sabe tienen una importante participación en los sistemas que modulan distintas funciones fisiológicas y conductuales, como la ansiedad (Flores Gracia, 2005), y por ello ha funcionado hasta el momento como uno de los objetivos principales tanto para la investigación sobre el funcionamiento de estos sistemas como para el desarrollo de fármacos más efectivos y seguros.

La ansiedad, por su lado, es una respuesta adaptativa fundamental para la supervivencia de un individuo pero, en su forma patológica es uno de los trastornos del estado de ánimo que afectan a una gran parte de la población, sin que aún se hayan podido establecer sus mecanismos etiológicos y sin que hasta el momento se haya encontrado un fármaco lo suficientemente potente y selectivo para ser usado en el tratamiento de los trastornos de ansiedad sin ningún efecto colateral indeseado.

El presente estudio representa una aproximación hacia estas dos vertientes, intentando responder a la pregunta de si existen receptores GABA<sub>C</sub> en la amígdala del lóbulo temporal, si estos receptores participan en los procesos de miedo y ansiedad que tienen lugar dentro de dicha estructura que es una de las zonas del cerebro que más se ha relacionado con este trastorno (Adolphs et al., 1995) y con ello también contribuir al estudio de la participación de este tipo de receptor tanto en el plano conductual como en la función amigdalina.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 ANSIEDAD**

En circunstancias normales, el sistema nervioso humano se encuentra preparado para advertir y movilizar al individuo en una de tres direcciones frente a una amenaza objetiva y físicamente peligrosa. Podemos luchar (atacar o defendernos), huir (abandonar el campo) o quedarnos bloqueados (paralizados); sin embargo, el rasgo característico del paciente ansioso es la percepción de una amenaza poderosa y la activación de los elementos fisiológicos asociados cuando no existe un peligro objetivo real (Stein y Hollander, 2006).

El concepto de ansiedad ha sido motivo de múltiples discusiones, esto por la dificultad para distinguirla de otras respuestas parecidas como el miedo o el estrés, de hecho es posible que juntos formen parte de un sistema de alarma que alerta al organismo ante diversos sucesos que lo pueden poner en desventaja (Flores Gracia, 2005).

A este respecto se ha llegado a algunos consensos: el miedo se entiende como una respuesta a un estímulo concreto y real, mientras que la ansiedad es una vivencia del temor ante algo difuso, vago, inconcreto, indefinido, que a diferencia del miedo, tiene una referencia explícita o lingüística. Comparte con el miedo la impresión interior de temor, de indefensión, pero mientras en el miedo esto se produce por algo real, en la angustia (o ansiedad) se produce por algo que no representa un peligro inmediato y puede ser que ni siquiera sea real (Rojas, 1998). De esta forma, La ansiedad patológica se diferenciaría de la normal sólo por su intensidad y su anacronismo, pero no por la cualidad de la emoción en sí misma ni por las reacciones fisiológicas observadas. Así, la ansiedad como síntoma, representa un continuo desde la emoción normal hasta la ansiedad patológica, la cual supera

los límites adaptativos y afecta de forma negativa al rendimiento y al funcionamiento psicosocial (Vallejo y Gastó, 2000).

De acuerdo con lo anterior, la ansiedad y el estrés resultarían términos sinónimos y el miedo una variante de ellos, en la que el estímulo que la provoca es conocido. Eventualmente, la ansiedad podría diferenciarse del estrés por la frecuencia en la que se presentan los estímulos. En la ansiedad bastaría que se presentara el estímulo ansiogénico una sola vez para que la respuesta se diera, en tanto que en el estrés el sujeto estaría por largo tiempo bajo la acción del estímulo “estresante” (Flores Gracia 2005).

La ansiedad es una experiencia humana universal y, desde luego, una emoción humana corriente, su evocación no implica necesariamente la presencia de un trastorno con repercusión clínica (Stein y Hollander, 2006). Sin embargo, cuando la ansiedad es excesiva o aparece como consecuencia de acontecimientos que no presentan un peligro real, es considerada un estado patológico sobre todo si es persistente (Kandel et al., 2001). Dicho trastorno implica una duración, una frecuencia, un número y una intensidad de los síntomas que deben resultar suficientemente significativos para mermar la calidad de vida de la persona; la ansiedad no es un trastorno único, sino que forma parte de un espectro de trastornos de ansiedad (Stein y Hollander, 2006).

### **2.1.1 Aspectos clínicos de la ansiedad**

Desde el punto de vista clínico, los trastornos de la ansiedad se presentan de diversas maneras. A manera de ejemplo, según el DSM-IV una crisis de ansiedad o de angustia es definida como: “la aparición súbita de síntomas de aprehensión, miedo pavoroso o terror, acompañados habitualmente de sensación de muerte inminente. Durante

estas crisis aparecen síntomas como falta de aliento, palpitaciones, opresión o malestar torácico, sensación de atragantamiento o asfixia y miedo a “volverse loco” o a perder el control (López-Ibor Aliño, 1997). La principal característica de una crisis de angustia es la aparición aislada y temporal de miedo o malestar de carácter intenso, que se acompaña al menos de 4 de un total de 13 síntomas somáticos o cognoscitivos. De acuerdo también con el DSM-IV, existen tres tipos característicos de crisis de angustia que se diferencian por el modo de inicio y la presencia o ausencia de desencadenantes ambientales:

**Crisis de angustia inesperadas.-** no relacionadas con estímulos situacionales, es decir, aparecen sin ningún motivo aparente.

**Crisis de angustia situacionales.-** desencadenadas por estímulos ambientales, aparecen inmediatamente después de la exposición o anticipación de un estímulo desencadenante.

**Crisis de angustia más o menos relacionadas con una situación determinada.-** simplemente tienen más probabilidades de aparecer ante el estímulo, pero pueden aparecer después de cierto tiempo de la exposición a éste.

Se consideran así mismo como trastornos de la ansiedad: a las crisis de angustia con o sin agorafobia, a la fobia específica y social, al trastorno obsesivo compulsivo, por estrés post-traumático, por estrés agudo, al trastorno de ansiedad generalizada, al trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica, o inducido por sustancias, y al trastorno de ansiedad no especificado (López-Ibor Aliño, 1997).

Cabe señalar que una proporción significativa de los pacientes con trastornos de angustia presentan alguna predisposición genética y que la mitad de los pacientes con crisis de angustia padecen de depresión, lo que ha llevado a sugerir que las crisis de angustia pueden ser una variante de la enfermedad depresiva o antecederla (Kandel et al., 2001).

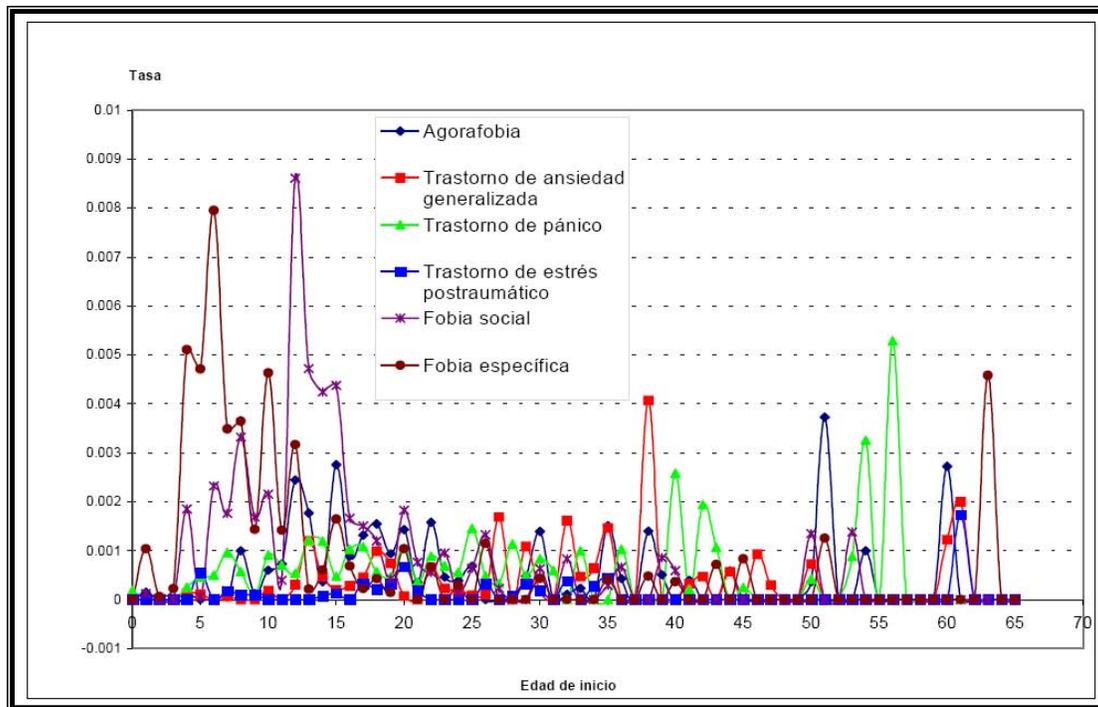
La encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México (ENEP) realizada en 2003 (Medina-Mora, et al. 2003) indica que en nuestro país, los trastornos neuropsiquiátricos ocupan el quinto lugar dentro de las enfermedades más comunes, al considerar como indicadores a la muerte prematura y a los días vividos con discapacidad, encontrándose el trastorno obsesivo compulsivo entre las primeras diez enfermedades más discapacitantes.

Medina-Mora et al. (2003) encontraron que dentro de los padecimientos neuropsiquiátricos, los trastornos de ansiedad fueron los más frecuentes en la población mexicana no-institucionalizada (14.3%), seguidos por el uso de sustancias de abuso y los trastornos afectivos. Un análisis general de esta encuesta permite observar que los trastornos afectivos y de ansiedad son más frecuentes en las mujeres, mientras que los trastornos por el uso de sustancias de abuso son más frecuentes en los hombres.

Los datos de la ENEP muestran que uno de cada 5 individuos presenta al menos un trastorno mental en un momento de su vida, en donde los trastornos de ansiedad son los más prevalentes y los más crónicos, los trastornos individuales más comunes fueron la depresión mayor, la fobia específica, la dependencia al alcohol y la fobia social.

En cuanto a la edad de inicio de estos trastornos, según los datos de Medina-Mora et al. (2003) (*Figura No. 1*), tanto la fobia específica como la social aparecen antes de los 15 años, mientras que el trastorno de ansiedad generalizada se inicia hacia la tercera década de la vida. La agorafobia y los ataques de pánico aparecen, en cambio, hacia la quinta década y el estrés postraumático después de la tercera edad. Es interesante notar que los trastornos de ansiedad están presentes ya de forma significativa entre los 5 y los 10 años de edad en la población del país, con excepción del trastorno de ansiedad generalizada y el estrés postraumático que aparecen en etapas posteriores.

Según el DSM-IV, los estudios de seguimiento efectuados en persona tratadas en centros de asistencia terciaria sugieren que al cabo de 6-10 años de tratamiento cerca del 30% de los individuos se recuperan, entre el 40 y el 50% han mejorado, y entre el 20% y el 30% restante permanece en igualdad de condiciones o incluso ha empeorado (Medina-Mora et al. 2003).



**Figura No.1 Incidencia de los trastornos de ansiedad en la República Mexicana.** La encuesta nacional de epidemiología psiquiátrica en México (ENEP) describe la prevalencia de los trastornos psiquiátricos, la comorbilidad, las variaciones en la distribución geográfica de los trastornos, los correlatos sociodemográficos y la utilización de servicios en la población urbana adulta. La ENEP se basa en un diseño probabilístico, multietápico y estratificado para seis regiones a nivel nacional, cuya población blanco fue la población no-institucionalizada, que tiene un hogar fijo, de 18 a 65 años de edad. La ENEP proporciona diagnósticos de acuerdo a la CIE-10. Se utilizó el método de Kaplan-Meier para generar las curvas de edades de inicio y las tasas (HAZARDS) presentadas en las gráficas, usando el paquete SAS. Los datos que se reportan aquí están basados en un total de 2,432 entrevistas.

Los picos que se observan se interpretan como los momentos de mayor actividad en el reporte de las edades de inicio. Se observan un gran número de altas y bajas en los "HAZARDS" que, sin embargo, tienden a concentrarse en las edades jóvenes (antes de los 15 años) (Medina-Mora et al. 2003)

En cuanto al tratamiento, un grupo de fármacos particularmente eficaz en el manejo del trastorno de ansiedad generalizada está constituido por las benzodiazepinas, como el clordiazepóxido (Librium) y su derivado el diazepam (Valium), que actúan facilitando la acción del ácido gama-aminobutírico (GABA) en los receptores GABA<sub>A</sub>,

Otros fármacos que al parecer han dado resultados también benéficos en estos trastornos son los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) aunque cabe señalar que ni estos ni las benzodiacepinas están libres de efectos adversos como son: tolerancia al fármaco, somnolencia y/o trastornos cognitivos y de memoria (Kandel et al., 2001; Flores Gracia, 2005). Adicionalmente, los tratamientos de tipo conductual que funcionan enseñando a los pacientes a identificar y controlar mediante el condicionamiento clásico, sus señales y funciones autónomas, (v.g. retroalimentación biológica o biofeedback) son también de gran utilidad.

### **2.1.2 Aspectos biológicos de la ansiedad**

Hacia 1939 Heinrich Kluver y Paul Bucy fueron pioneros en mostrar la relación entre el sistema límbico y particularmente uno de sus componentes, la amígdala, con la ansiedad. Sus estudios con monos mostraron que las lesiones bilaterales del lóbulo temporal, que incluían a la amígdala en su totalidad (*Figura No.2*), producían una disminución de la ansiedad acompañada de alteraciones en la conducta sexual, hiperfagia, déficit de memoria, apatía, imposibilidad para reconocer objetos o caras, entre otros síntomas (Kluver y Bucy 1997). Por otro lado, tanto en pacientes que padecen la enfermedad de Urbach-Wiethe<sup>1</sup>, como en aquellos que poseen diferentes lesiones en el lóbulo temporal, se ha observado que la estimulación de la amígdala produce sensaciones de miedo y que la lesión de ésta produce alteraciones en la emocionalidad de los pacientes, que se manifiestan como apatía, letargia, insensibilidad emocional y disminución de

---

<sup>1</sup> La proteínosis lipoidea (LiP), también conocida como "hialinosis de cutis y mucosa" o enfermedad de Urbach-Wiethe es un síndrome autosómico recesivo muy raro que produce almacenamiento de lipóide con múltiples infiltraciones de un material céreo en la piel y membranas mucosas de la boca, faringe y laringe que impide el llanto. No hay aparentemente anomalías viscerales, pero dentro del SNC produce calcificaciones, especialmente en la amígdala de los lóbulos temporales mediales, hasta en un 75% de los casos. La enfermedad suele ir asociada a ataques de epilepsia, y a retraso mental (IQB, Medciclopedia, 2007)

respuestas emocionales (Adolphs et al., 1995; Adolphs y Damasio, 1998; Adolphs et al., 1999; Torras y Morgado, 2001; Siebert y Bartel, 2003; Adolphs et al., 2005;). Las lesiones amigdalinas, por otro lado, parecen dificultar la capacidad para reconocer o recordar el significado afectivo de diferentes expresiones faciales, especialmente las referentes al miedo (Adolphs et al., 1994; Hamann et al., 1996; Adolphs et al., 1999; Bechara y Damasio, 2003; Dolan y Vuilleumier, 2003; Vuilleumier et al., 2004; Phelps y LeDoux, 2005; Sander et al., 2005; Vuilleumier, 2005; Vuilleumier y Pourtois, 2007) pues al parecer la lesión de esta estructura deteriora el reconocimiento de estímulos emocionalmente activadores o de sus recuerdos, independientemente de la modalidad sensorial con la que se presentan (LeDoux y Milner, 1991; Zald y Pardo, 1997; LaBar et al., 1998; Adolphs et al., 2000; Royet et al., 2000; Torras y Morgado, 2001; Miranda et al., 2002; Majak y Pitkänen, 2003; Zald, 2003).

A pesar de la información anterior es importante tomar en cuenta el concepto de sistema funcional establecido por A.R. Luria (1988), pues nos aclara que las funciones psíquicas superiores sólo pueden existir gracias a la interacción de estructuras cerebrales altamente diferenciadas, cada una de las cuales hace un aporte específico propio al todo dinámico y participa en el funcionamiento del sistema cumpliendo funciones propias; es por esto que a pesar de la importancia de esta estructura, se debe tomar en cuenta los numerosos estudios que han mostrado que no existe una región única encargada de la integración y modulación de la ansiedad, sino que existen diferentes centros nerviosos que participan en su producción y modulación. Además de la amígdala varias regiones del sistema límbico han sido implicadas: septum lateral, hipocampo, hipotálamo, sustancia gris periacueductal (SGP), núcleos del rafe dorsal y locus ceruleus, entre otros (Pérez de la Mora, 2003). Debido a que no podemos localizar a la ansiedad en una única estructura, es

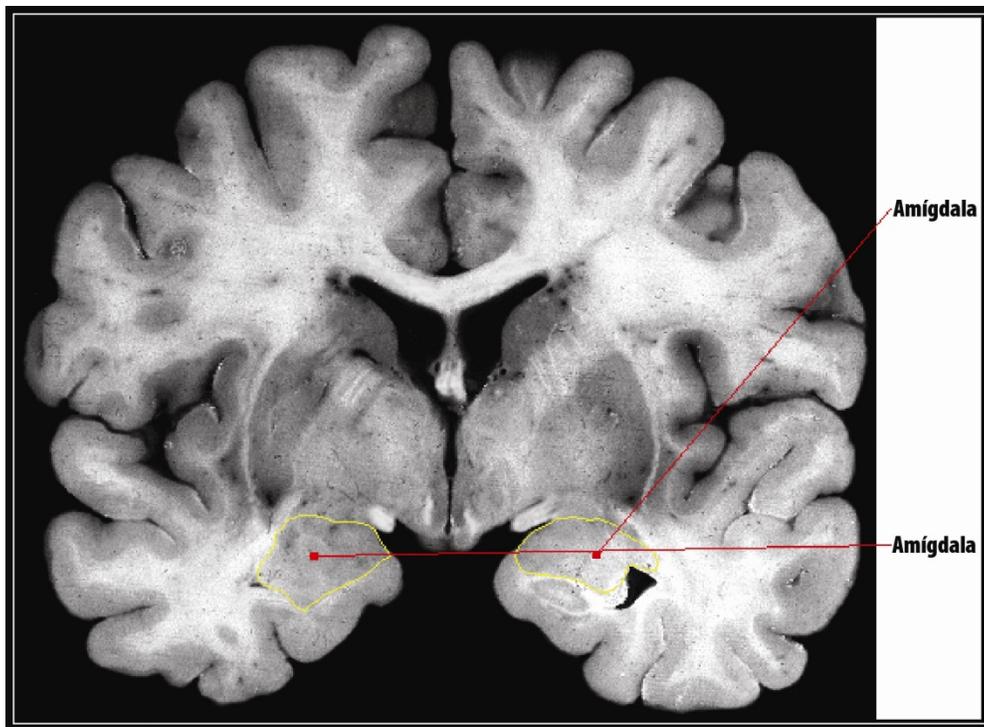
importante tomar en cuenta que existen sistemas de interconexión que pueden afectar la función amígdalina de forma directa o indirecta; al igual que otras funciones complejas que comparten una o varias estructuras con el sistema que modula la ansiedad, como la atención, la vigilia, o la motricidad, y que podrían verse afectadas o afectar a su vez a este sistema.

## **2.2 SISTEMA AMIGDALINO**

Acorde con estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) y resonancia magnética funcional (fMRI) en humanos, así como de paradigmas probados en roedores y primates, una de las mayores funciones de la amígdala es la formación de asociaciones y/o recuerdos que involucran eventos emocionalmente activadores (Cahill et al., 1995; Adolphs y Damasio, 1998; Cahill y McGaugh, 1998; LaBar et al, 1998; Vazdarjanova y McGaugh, 1999; McGaugh, 2002; Pitkänen et al., 2003; McGaugh, 2004). A este respecto, se ha sugerido que la amígdala podría ser clave en el proceso por el cual los estímulos adquieren carga emocional o motivacional y en la generación de respuestas adecuadas (Cahill et al., 1995; Cahill et al., 1999; LeDoux, 2003; McGaugh, 2004). En otras palabras, para que se produzca el aprendizaje clásico del condicionamiento al miedo, tienen que converger, en alguna zona del cerebro, las vías que transmiten la información del estímulo condicionado (EC) con las que transmiten la información del estímulo incondicionado (EI), la amígdala es al parecer la estructura que posibilita la formación de asociaciones entre estos estímulos

ayudando a establecer el significado emocional de diferentes situaciones (Torras y Morgado, 2001).

Aunque parece confirmado que la amígdala tiene una función en la modulación de este tipo de aprendizaje y su consolidación en la memoria, esto no necesariamente debe ser compatible con el hecho de que esta estructura sea un lugar de almacenamiento de las memorias emocionales. Existen, por ello, evidencias contradictorias al respecto pues mientras algunos piensan que esta estructura funciona como almacén de memoria, otros afirman que actúa sólo como un modulador potenciador, o como un lugar de asociación entre diferentes aferencias sensoriales (Cahill y McGaugh, 1998; Cahill et al., 1999; LeDoux, 2000; McGaugh, 2002; McGaugh, 2004; Vazdarjanova y McGaugh, 1998; Wilensky y LeDoux 2000; Wilensky et al., 2006).



*Figura No. 2* Localización de la amígdala en el cerebro humano (imagescope.org)

### **2.2.1 Filogenia y ontogenia**

Desde el punto de vista filogenético, la amígdala está constituida por dos partes: la amígdala medial (MeA) y la central (CeA) que representan la parte más temprana; y las porciones basal (BA), lateral (LA) y cortical (CoA) que fueron adquiridas con posterioridad (McDonald, 2003).

Tanto el núcleo CoA como el basolateral (BLA), constituido por el núcleo lateral (LA), el basal (BA) y el basomedial (BM), parecen estar asociados anatómicamente con una fisura prominente a la que se le llamó la fisura amigdalóidea. Esta parte caudal del surco entorrinal separa al núcleo cortical de la corteza piriforme adyacente. Caudalmente, esta fisura rodea el polo caudal de la amígdala y es separado de ésta por la corteza entorrinal. Se ha sugerido, que tanto los núcleos BA como LA fueron formados por neuronas que emigraron de las regiones corticales a esta región (McDonald, 2003). Estudios subsecuentes indicaron que por el contrario, esta situación fue más bien el resultado de neuronas del mismo grupo que no migraron a la superficie cortical. La fisura amigdalóidea es un rasgo característico del cerebro de los mamíferos, aunque ha sido encontrada una fisura similar en reptiles y lisencéfalos (McDonald, 2003).

Según Rainnie (2003), a lo largo de la evolución, el volumen del núcleo BLA se incrementó desproporcionadamente en comparación con el CeA. Este incremento en el volumen del núcleo BLA, podría reflejar un aumento en la complejidad de los procesos emocionales.

A lo largo de la filogenia de los mamíferos, Price (2003), considera que la conectividad de la amígdala está relacionada con tres grandes sistemas:

- El sistema de fibras que viene de la base del cerebro y provee de información sensorial a la amígdala. Dicho sistema tiene su origen en la corteza olfativa ascendente, en las vías que transportan información viscerosceptiva y gustativa, en el tálamo posterior y en las áreas de asociación cortical.
- Los sistemas de proyección de la amígdala hacia el tallo cerebral (la vía amigdalofugal ventral y la estría terminal), que se extienden principalmente al hipotálamo y a la médula espinal y están implicadas en la respuesta visceral a los estímulos emocionales.
- Las conexiones recíprocas que se establecen entre la amígdala con áreas de la base del lóbulo frontal ventromedial, la ínsula rostral, la corteza temporal rostral, el tálamo medial y los ganglios basales ventromediales.

Respecto al desarrollo ontogenético del complejo amigdalino se sabe que éste se deriva de la eminencia ganglionar, que proviene de una delgada zona proliferativa del telencéfalo y es discernible durante todo el periodo prenatal (Ulfig y Bohl, 2003). El desarrollo fetal de la amígdala se observa desde el quinto mes de gestación en donde el primordio del BLA surge de la llamada eminencia ganglionar. Entre el sexto y séptimo mes de gestación las columnas de células del BLA tienen su mayor periodo de crecimiento y comienzan a perder contacto con la eminencia ganglionar. Al octavo y noveno mes de gestación, los bultos de las columnas celulares no son ya detectables y se alcanza a observar un grupo de células que claramente separa al núcleo lateral de la eminencia ganglionar. Cabe resaltar que el núcleo corticomediale (CoAm) revela sinaptogénesis desde el quinto mes, a diferencia del BLA que la revela hasta el séptimo mes. Esta desincronía podría estar asociada con la temporalidad con que la que aparecen sus conexiones específicas con la corteza de asociación. (Ulfig y Bohl, 2003).

### **2.2.2 Anatomía**

A principios del siglo XIX, Karl Friederich Burdach, mediante una inspección visual de tipo topográfico, discriminó a lo que hoy conocemos como el núcleo BLA del complejo amigdalino, núcleo que según él, tenía un gran parecido con una almendra, por lo que decidió llamarlo amígdala (Swanson, 2003). No mucho tiempo después, otro gran anatomista, Meynert, hizo notar que la amígdala de Burdach es sólo una extensión del claustró del lóbulo temporal, que representa a la capa más profunda de la corteza cerebral. (Swanson, 2003).

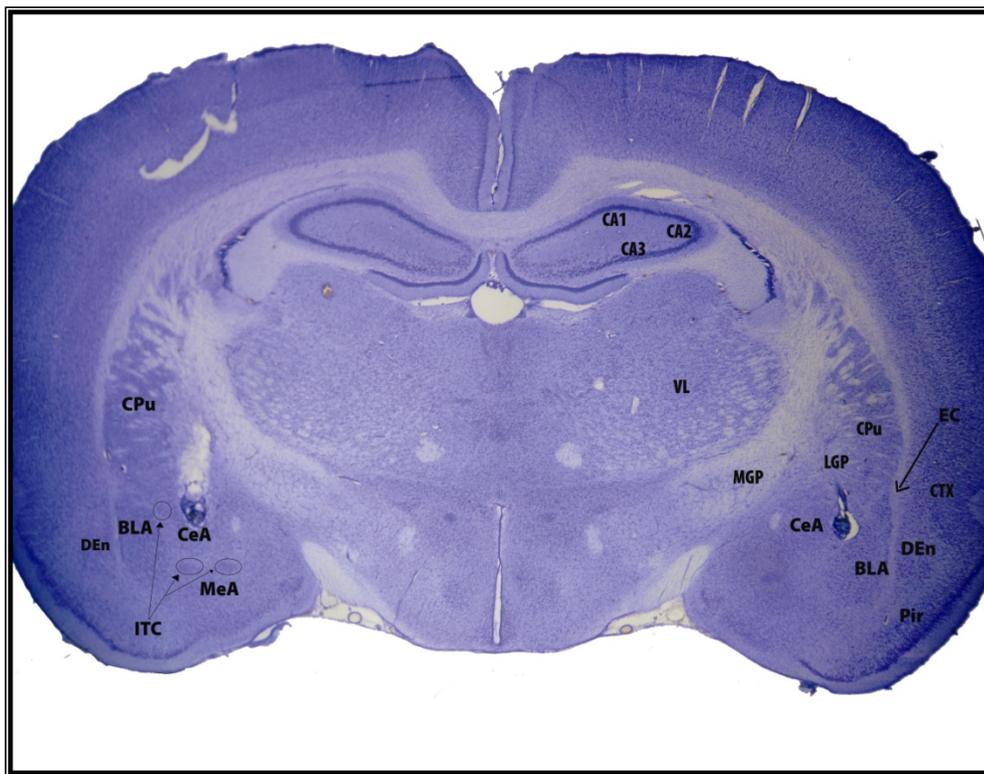
Hacia 1923 Johnston, introdujo una descripción fundamental, al proponer que la amígdala estaba formada por un grupo más “primitivo” de células asociado con el sistema olfativo que corresponde a los núcleos central (CeA), medial (MeA), cortical (CoA) y del tracto olfativo lateral (NLOT); así como por un grupo filogenéticamente más tardío: el núcleo lateral (LA) y el basal (BA). Johnston también describe y nombra las masas o islas intercaladas (ITC) y menciona que el NLOT tiene una relación muy cercana con los otros núcleos amigdalinos (McDonald, 2003).

Existen otras clasificaciones un tanto menos utilizadas, por ejemplo, la de Edinger y Kappers; que dividen al encéfalo en paleoestriado, paleocorteza, arquiestriado, arquicorteza, neoestriado y neocorteza, dentro de ésta clasificación se ubica a la amígdala dentro del arquiestriado (McDonald, 2003). Otras clasificaciones la refieren simplemente como parte del rinencéfalo o del sistema límbico (McDonald, 2003).

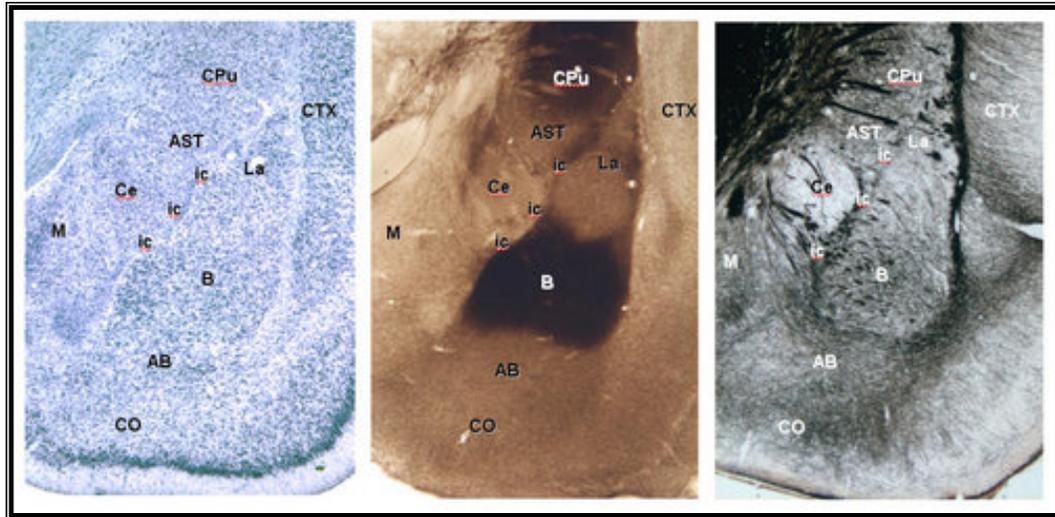
Price, por su lado, propone que la amígdala es una entidad circunscrita que posee 4 divisiones: basolateral (BLA), corticomedia (CoAm), núcleo central (CeA) y núcleo

anterior (AA) (McDonald, 2003), ésta clasificación es la más aceptada y la que tomaremos en cuenta en este trabajo.

Swanson y Petrovich (1998) sugieren que Meynert estaba en lo correcto en asignar al BLA, como una extensión del claustró pero, dorsalmente adyacente al núcleo endopiriforme (*Figura No.3*). Swanson sugiere también que el BLA forma por lo menos parte de la subplaca que forman las cortezas temporal, piriforme y quizás, frontal; pero que está separada de las capas más superficiales de la corteza por una lámina de fibras denominada cápsula externa, que recientemente ha sido llamada también cápsula amigdalina (*Figura No.3*).



**Figura. No. 3** Localización de los núcleos amígdalinos en el cerebro de la rata (tinción de cuerpos celulares de Nissl). Obsérvese la forma de almendra de ambos núcleos basolaterales (BLA), misma que sirviera para dar nombre a ésta estructura. Note también la disposición dorsalmente adyacente del BLA al núcleo endopiriforme dorsal (DEn), así como la separación entre dicho núcleo y la amígdala por la cápsula externa (EC). Del lado izquierdo se puede observar claramente la disposición de las islas de células intercaladas (ITC). Las ITC laterales se encuentran entre los núcleos BLA y central (CeA), así como las mediales entre el núcleo medial (MeA) y el CeA. Abreviaturas: CTX corteza, Cpu caudoputamen, MGP globo pálido medial, LGP globo pálido lateral, Pir corteza piriforme, VL núcleo talámico ventrolateral. Sección coronal representativa a nivel de -2.30mm acorde con el atlas de Paxinos y Watson (1998).



**Figura.No. 4 Distribución de los núcleos amigdalinos en el cerebro de rata.** Se presentan distintos métodos de tinción que muestran a los núcleos amigdalinos desde distintas perspectivas. De izquierda a derecha: tinción de cuerpos celulares de Nissl, tinción de acetilcolinesterasa y tinción de reticulina. Observe la distribución de los núcleos amigdalinos medial y central más cercana al estriado así como la parte basolateral más cercana a la corteza cerebral.

Abreviaturas: AB núcleo basal accesorio, B núcleo basal, Ce núcleo central, Ic islas de células intercaladas, La núcleo lateral, M, núcleo medial, CO núcleo cortical, AST, área de transición amigdaló-estriatal; CPu, caudo putamen; CTX, corteza cerebral.

Los hemisferios cerebrales están constituidos por dos macroestructuras: las regiones corticales caracterizadas por poseer neuronas glutamatérgicas de proyección, y regiones pálido estriadas caracterizadas por contener neuronas principalmente GABAérgicas (Swanson, 2003).

McDonald, enfatizó que las neuronas de proyección en el BLA tienen apariencia de células corticales de proyección, y sugiere, al igual que Swanson, que la región amigdalina está claramente dividida en una parte cortical y una parte estriatal (McDonald, 2003)

(Figura No 4).

Swanson (2003) propone que los grupos de células de la amígdala están asociados por lo menos con 4 sistemas funcionales directamente interrelacionados: el cortical, el olfativo, el autonómico y el frontotemporal, lo que hace difícil para ellos, y para muchos otros autores, ver a la amígdala como una sola unidad estructural o funcional, sino que más bien se le concibe como una colección de células adyacentes. En concordancia con esto los

núcleos amigdalinos, a diferencia del tálamo, reciben aferencias directas de todas las modalidades sensoriales (Swanson, 2003).

Por otro lado, en los últimos años se ha considerado a otras partes de la base del cerebro como constituyentes de una amígdala mas grande denominada por de Olmos y Heimer (1999) como la amígdala extendida (EA), que básicamente consiste de 3 partes: la parte caudal del núcleo sublenticular (SN), la substancia innominata (SI) y la cama del núcleo de la estría terminal (BST), cada uno de ellas forma divisiones mediales y laterales, que se encuentran asociadas con los núcleos medial y central de la amígdala, respectivamente.

En resumen, según Swanson (2003), la mayor parte de la amígdala está formada por componentes del sistema olfativo accesorio y principal. El CeA sería entonces una región especializada del estriado que proyecta a los centros viscerales del tallo y recibe señales de la corteza prefrontal, insular, temporal y áreas temporales olfativas. Los núcleos LA y BLA aparecen a su vez como una extensión ventromedial del claustró que reciben información de amplias regiones de la corteza frontal y temporal, proyectando al cuerpo estriado, (caudoputamen y núcleo accumbens (N Acc)) así como por supuesto al núcleo CeA (Swanson y Petrovich, 1998).

### **2.2.3 Conexiones, vías aferentes y eferentes**

La amígdala es parte del circuito orbital que incluye la corteza prefrontal medial (mPFC), tálamo medial, N Acc y pálido ventral, éste circuito proyecta al hipotálamo y a la sustancia gris periacueductal (SGP) (Price, 2003).

El N acc, llamado también estriado ventral, manda proyecciones GABAérgicas a la sustancia innominata (pálido ventral y rostral) quien a su vez envía fibras al núcleo talámico medio dorsal (MD). En este núcleo, las fibras GABAérgicas provenientes de la SI terminan en las mismas neuronas que las fibras glutamatérgicas que vienen del BLA, porque el MD es un núcleo talámico que tiene conexiones recíprocas con el circuito orbital. Dado que el tálamo medial proyecta a la mPFC, estas últimas aferencias constituyen una vía adicional por medio de la cual la amígdala puede influenciar la función de esta región cortical y viceversa (Price, 2003). La corteza medial prefrontal se divide en 22 zonas citoarquitectónicas que se pueden dividir en dos redes principales: **La red orbital**, que implica áreas de la corteza prefrontal medial (mPFC), así como áreas de la corteza orbital lateral y ventromedial (gyrus rectus); y **la red medial** que está conectada con áreas polisensoriales en el giro y el surco superior temporal y envía eferencias a hipotálamo y a la SGP. Las conexiones recíprocas de la amígdala, en primates, se unen con ambas redes, aunque predomina la interconexión con la red medial (Price, 2003).

Las mayores aferencias corticales que llegan a la amígdala provienen de la corteza de asociación sensorial, es decir, de la corteza tèmpero-parieto-occipital (TPO), de la corteza temporal anterior (información auditiva) y de la ínsula (información visceral). En todos estos casos las fibras córtico-amigdalinas terminan principalmente en regiones del BLA (Price, 2003).

Tanto en primates como en roedores, las proyecciones mas importantes que van desde la amígdala hasta la formación hipocampal y parahipocampal se originan en el BLA. El núcleo BA proyecta fuertemente a las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. Las eferencias amigdalinas más importantes a las cortezas entorrinal, perirrinal, y postrinal, se originan en

el BLA. El parasubículo es innervado principalmente por los núcleos LA y BA. Aunque existen conexiones recíprocas entre el hipocampo y la amígdala, las aferencias que llegan a la amígdala son más numerosas que las eferencias que llegan al hipocampo provenientes del CeA (Majak y Pitkänen, 2003).

Un rasgo común del complejo BLA, el núcleo endopiriforme y el claustró, es la existencia de extensas proyecciones que regresan a la región cortical que las innerva. Dicho rasgo trae consigo relaciones topológicas básicas. Swanson propone que el núcleo BM y el núcleo BLA, son componentes subcorticales que corresponden a las regiones de asociación del órbito frontal, insular y ventral temporal. Por otro lado estudios anatómicos sugieren que tanto el núcleo LA como el BA, representan, como ya se ha mencionado antes, una extensión ventromedial del claustró relacionada más cercanamente con el lóbulo temporal y los lóbulos frontales. Ambos núcleos, forman conexiones bidireccionales con el sistema olfativo y las regiones prefrontales e insulares. El núcleo LA innerva directamente al CeA, e indirectamente a BM posterior y BLA posterior, al tiempo que se distingue por sus conexiones con la corteza temporal y con regiones hipocámpales. De la misma forma, el núcleo BLA cuenta con conexiones que alcanzan áreas somatosensoriales y motoras en las cortezas frontal y parietal. Ambos innervan al caudoputámen, así como al N Acc (Swanson y Petrovich, 1998).

El CeA representa la porción medial del estriado y constituye la estación de salida de la amígdala, pues sus dos grandes eferencias, la vía amígdalofugal ventral y la eferencia terminal, alcanzan a una gran variedad de núcleos autonómicos entre los que se incluyen al hipotálamo lateral, al núcleo motodorsal del vago, al núcleo del tracto solitario (NTS), al núcleo parabraquial, a la SGP y al núcleo reticulopontino. El CeA recibe a su vez un gran

rango de información sensorial proveniente de aferencias corticales, tálamicas, del tallo cerebral, del sistema olfativo principal, y del tálamo ventricular (Swanson y Petrovich, 1998).

#### **2.2.4 Las islas de células intercaladas (ITC) como una interfase entre el BLA y el CeA.**

Las islas intercaladas de la amígdala (ITC) son grupos de células GABAérgicas interconectadas e interpuestas entre el núcleo BLA y el CeA. Dichas islas reciben aferencias glutamatérgicas del complejo BLA y proyectan sus fibras al CeA y a otras islas vecinas, esto ha sido mostrado en la rata, el gato, el cuyo y el mono (Royer y Pare, 1999). Estas islas o grupos de células representan una interfase inhibitoria entre las estaciones de entrada (LA Y BA) y de salida (CeA) de la amígdala (Royer y Pare, 1999). Tanto la isla intercalada principal (Im), como las intercaladas paracapsulares, laterales y mediales (Ip), son ricas en receptores dopaminérgicos del tipo 1 (D1) comparados con otros núcleos amigdalinos. De la misma manera el RNAm que codifica para estos receptores es también expresado en estas estructuras. Hay que destacar sin embargo que dentro de la Im coexisten tanto receptores D1 como D2 (Scibilia y Kilts, 1992).

Marowsky et al. (2005) demostraron que las ITC laterales se parecen a las mediales en aspectos fisiológicos y funcionales, lo que provee evidencia de que la conectividad de las ITC constituye una red especial de interneuronas que funcionan para comunicar a los núcleos amigdalinos. Dichos autores usaron ratones que expresan GFP (Green Fluoresce Protein) en interneuronas GABAérgicas con lo que pueden identificar a las ITC en rebanadas y estudiar su conectividad además de la respuesta a la dopamina (DA). Sus

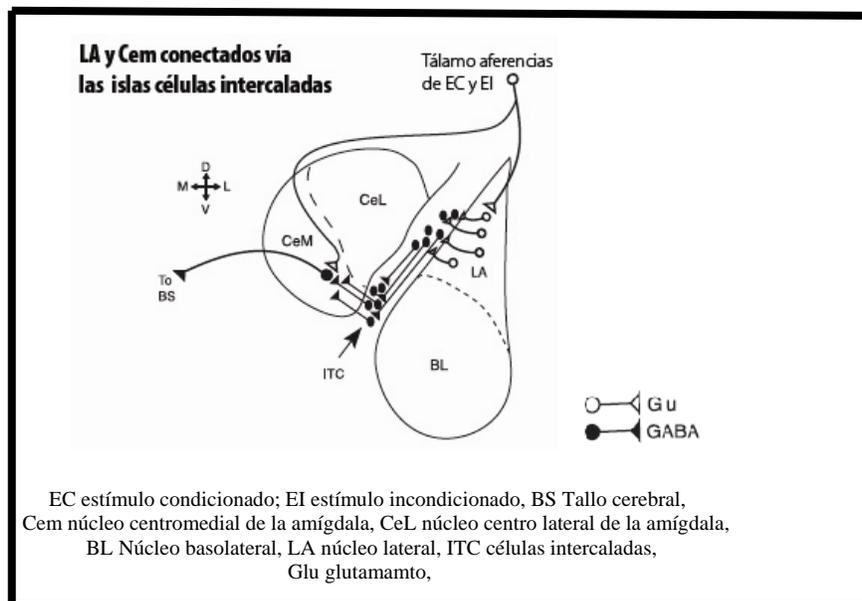
estudios junto con los de Pare et al. (2003) indicaron que las ITC forman un sistema interconectado que provee de inhibición al BLA y al CeA y que muestra una modulación por DA que se ejerce sobre los receptores D1 que no se encuentran en otras neuronas en la amígdala (Marowsky et al, 2005). Es importante señalar que las ITC están polarizadas en dirección lateromedial siendo el núcleo central su principal sitio de proyección (Royer y Pare, 2000) y que sus propiedades intrínsecas de membrana, las posibilita a actuar como una puerta dependiente del contexto que puede inhibir o potenciar el impacto de los impulsos del BLA en las neuronas del CeA (Fuxe et al., 2003; Rainnie, 2003; Pare et al., 2003; Pare et al., 2004).

Pare et al. (2003) sugieren que fuertes redes dentro de la amígdala pueden distinguir entre aferencias sensoriales de distintas fuentes, y que esto puede variar la respuesta de la amígdala acorde a la exigencia de cada tipo de estímulo. Esto puede ser ventajoso para separar la actividad entre el complejo BLA y el núcleo CeA porque podría ayudar a responder idealmente al entorno. Dado que las aferencias del estímulo incondicionado y el condicionado convergen en neuronas del LA (Pare, 2003), el incremento de las aferencias glutamatérgicas a las células GABAérgicas intercaladas paracapsulares (Ip) situadas en posiciones rostromediales, podría inhibir a las islas más caudales y mediales, resultando en una desinhibición del CeA (*Figura No. 5*) y esto a su vez, en el desarrollo de un miedo patológico (crisis de ansiedad) (de la Mora et al, 2005). En este sentido, el aprendizaje y la memoria al miedo pueden tener lugar en las ITC, lo que permitiría el establecimiento de respuestas adecuadas a éste. Parece ser que la transmisión dopaminérgica, sináptica y perisináptica más eficiente y rápida puede favorecer fuertemente el aprendizaje y la formación de la memoria a largo plazo en las ITC (Fuxe et al., 2003). Lo anterior es importante, no sólo para la consolidación de la memoria al miedo y de la expresión a éste,

si no también para la consolidación de la extinción de éste tipo de respuestas. Existe evidencia de que la corteza prefrontal medial (mPFC) y la corteza infralímbica (IL) (*Figura No. 6*) participan en el almacenaje de la memoria de extinción (Phelps et al., 2004).

Estudios recientes en pacientes con trastorno por estrés postraumático (PTSD) muestran un decremento en la actividad de la corteza prefrontal medial (mPFC) y del cíngulo anterior, correlacionando con un incremento de la actividad en la amígdala (Bremner, 1999; Bremner et al., 1999; Koenigs et al., 2007). Dado que la extinción es la base de la terapia de exposición para el PTSD, una estrategia obvia de terapia, de acuerdo con Pare et al. (2004), sería la consolidación de la extinción.

Ante la importancia de este tipo de control cortical sobre la amígdala, Quirk et al. (2003) estudiaron el efecto de la pre-estimulación de la mPFC sobre la actividad del núcleo centro-medial (Cem) y encontraron que la respuestas de salida de este núcleo se ven significativamente reducidas. Dado que estas dos estructuras tienen muy pocas conexiones recíprocas, Likhtik et al. (2005) se dieron a la tarea de investigar si esta inhibición se daba

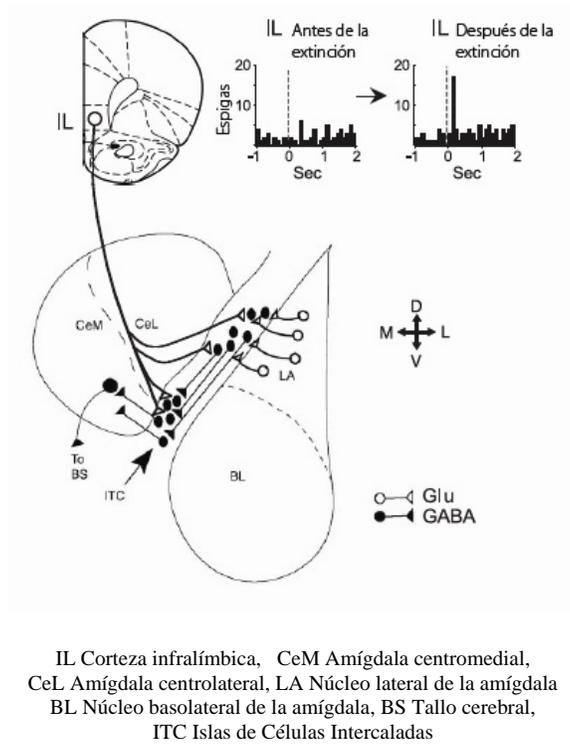


*Figura No 5. Las islas intercaladas paracapsulares (ITC) como una interfase entre los núcleos BLA y CeA.* Nótese que las ITC de naturaleza GABAérgica, se encuentran polarizadas, en forma tal, que los estímulos provenientes del núcleo LA, al que llegan diversos tipos de información sensorial, alcanzan a islas localizadas en las posiciones más laterales del espacio paracapsular. Dichas islas, envían eferencias a otras islas situadas dentro del mismo espacio paracapsular pero más medialmente dispuestas, las que a su vez proyectan al CeA, en donde dado su carácter inhibitorio mantendrían bajo control a las neuronas de dicho núcleo. Dado que las neuronas del CeA proyectan a distintos núcleos autonómicos, la activación de estos núcleos por la eferencias amigdalinas sería la responsable de la instalación de una respuesta ansiosa acorde a las circunstancias que la provocan. Esquema tomado de Pare et al.(2004).

por la mediación del núcleo BLA y encontraron que la actividad del BLA no era la responsable de ésta inhibición, sino que probablemente son las ITC quienes mantienen tónicamente inhibido al CeA y reciben aferencias de la mPFC. Marowsky et al. (2005) por su lado, apoyan la idea de que las ITC localizadas entre las fibras de la cápsula externa (Ip) están involucradas en la inhibición de la mPFC sobre la salida ansiogénica de la amígdala mediada por la actividad del CeA, pero a diferencia de lo discutido por Litkhik et al.(2005) suponen que esto no ocurre por una acción inhibitoria directa de las ITC sobre el CeA sino provocando una defacilitación de las células de proyección del BLA (Marowsky et al., 2005). Esto es apoyado por los datos sobre la innervación en BLA, donde se observa que mPFC manda fuertes proyecciones a las ITC del BLA (McDonald et al., 1996), y éstas a su vez al Cem (Royer et al., 1999 ).

En resumen, es posible que la mPFC inhiba a las células del Cem a través de la activación de una o más poblaciones de células GABAérgicas como las ITC, quienes reciben impulsos desde mPFC y proyectan al BLA y al Cem. Existe la posibilidad de que la adquisición de las respuestas condicionadas al estímulo condicionado por neuronas de la mPFC durante el aprendizaje de extinción sirva para generar suficiente depolarización en las ITC para lograr la potenciación a largo plazo (LTP) dependiente de receptores NMDA (*Figura No. 6*);





**Figura No. 6** El aprendizaje de extinción incrementa la actividad en la corteza infralímbica (IL), esto puede inhibir la expresión del miedo vía las células intercaladas (ITC). **Izquierda:** esquema de un corte coronal de cerebro de rata que muestra la proyección de la IL hacia las ITC. La excitación de las ITC por los axones de IL produce una inhibición hacia adelante de las neuronas del Cem, quienes a su vez proyectan al tallo cerebral. **Derecha:** histograma de la actividad evocada en IL por tonos auditivos condicionados a un choque eléctrico antes (izquierda) y 24 horas después (Derecha) del entrenamiento de extinción. La línea punteada indica el momento en que se aplicó el tono auditivo durante 50mseg. Tomado de Paré et al. (2004).

como resultado de ello, durante las presentaciones subsecuentes del estímulo condicionado, el BLA evoca relativamente más inhibición que excitación en las neuronas de salida del Cem. Esto permite eventualmente la supresión de las respuestas al miedo condicionado (Likhtik et al., 2005).

## 2.3 LOS RECEPTORES GABAÉRGICOS C

### 2.3.1 El GABA y su importancia en la ansiedad

El ácido  $\gamma$  – aminobutírico (GABA) es un aminoácido neurotransmisor de bajo peso molecular encontrado a lo largo de todo el SNC y el SNP. El precursor del GABA es el ácido glutámico o glutamato (principal aminoácido excitador del SNC), quien luego es descarboxilado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) para convertirse en GABA,

aunque *in vivo* se ha observado que el piruvato y otros aminoácidos también sirven como precursores (Flores Gracia, 2005). Aproximadamente el 30% de las sinapsis del SNC son GABAérgicas (Haefely et al., 1992), donde el GABA tiene una acción principal como inhibidor y es esencial para mantener el balance entre la excitación y la inhibición neuronal.

Dentro del SNC el GABA se localiza de forma extensa en las neuronas locales de la neocorteza (Galarreta y Hestrin, 2002), en hipocampo (Ivanova et al., 2004) y ganglios basales (Di Cara et al., 2003; Kirouac et al., 2004). En el hipotálamo se han encontrado niveles más altos sobretodo en la región preóptica y en las áreas anteriores (Herman et al., 2004), así como en el cerebelo (Chavas y Marty, 2003), los núcleos del Rafé (Kirouac, et al., 2004), la amígdala (Swanson y Petrovich, 1998; Pare et al., 2003; Delaney and Sah, 1999), la médula espinal (Riedel et al., 2002), Etc.

El GABA juega un importante papel en la analgesia, la anestesia, la percepción del dolor, la depresión, la memoria, la regulación hormonal y la secreción neuroendocrina del tracto gastrointestinal, así como en la ansiedad y los trastornos relacionados (chebib, 2004). Los primeros hallazgos que ayudaron a relacionar al GABA con la ansiedad se observaron en 1975 cuando distintos laboratorios postularon simultáneamente la posible acción de las benzodiazepinas a través de mecanismos GABAérgicos (Costa et al., 1975; Fuxe et al., 1975; Haefly et al., 1975); acción que fue confirmada con la identificación de los sitios de reconocimiento para estos fármacos (Mölher, 1977; Squires y Bastrup, 1977).

Después de dichos hallazgos, la investigación en torno a la relación del GABA y la ansiedad ha sido extensa, con lo que se puede afirmar que las estructuras involucradas en la ansiedad contienen las mayores redes de interneuronas GABAérgicas, así como en algunos casos también, neuronas de proyección (Cherubini y Conti, 2001; Mody, 2001).

Desde luego la actividad cerebral producida por la ansiedad no está reducida a éste aminoácido, sino que se requiere de la interacción de varios agentes neurotransmisores como el glutamato, que produce efectos ansiogénicos en las ratas bajo distintas pruebas conductuales (Jardim y Guimaraes, 2004; Pérez de la Mora et al., 2006); las catecolaminas (NA y DA) quienes al parecer tienen papeles contrarios en la modulación de la ansiedad (Cameron et al., 2004; Rozog et al., 2004); así como también la acetilcolina (ACh) presenta actividad ansiolítica (Battaglia et al., 2001), mientras que la colecistokinina (CCK) se correlaciona con conductas de mayor ansiedad en el laberinto elevado en forma de “+” (Hernández-Gómez et al., 2002), y al parecer modula los mecanismos glutamato-GABAérgicos por medio de los receptores CCK-2 (Pérez de la Mora et al., 2007).

Se sabe que las vías GABAérgicas ejercen una influencia inhibitoria sobre la liberación de diferentes neurotransmisores por lo que es posible que el resto de los sistemas de neurotransmisión tengan como función principal modular a su vez a sistemas primarios, como el glutamatérgico y el GABAérgico, en aquellas regiones del cerebro implicadas en la ansiedad (Flores Gracia, 2005).

### **2.3.2 Diferencias y semejanzas de los receptores GABAérgicos**

Hasta el momento se han identificado y consensuado tres clases de receptores que se activan ante el GABA, nombrados GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y GABA<sub>C</sub>, según el orden en que fueron descubiertos. Los tres poseen características distintivas; los GABA<sub>B</sub> son receptores metabotrópicos que a través de la formación de segundos mensajeros intracelulares activan

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$  vía fosfolipasa C y adenilatociclasa. Estos son selectivamente activados por baclofen y CGP27492 un análogo de GABA, y son antagonizados por faclofen, saclofen y 3-APMPA, mientras que no responden a casi ninguno de los fármacos moduladores de los  $\text{GABA}_A$  ni de los  $\text{GABA}_C$  (Chebib y Johnston, 1999).

$\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_C$  son receptores ionotrópicos, ambos miembros de la superfamilia de receptores asociados a canales iónicos regulados por ligando, que también incluye a los nicotínicos acetilcolinérgicos, a los serotoninérgicos del tipo 3 ( $5\text{-HT}_3$ ), y a los sensibles a glicina/ estriquina (Johnston et al., 2003). Dentro de esta familia los receptores más estudiados son los nicotínicos, los más heterogéneos son los  $\text{GABA}_A$ , y paradójicamente los más simples y homogéneos en su composición son los  $\text{GABA}_C$  (Johnston et al., 2003).

Las subunidades en la superfamilia de receptores-canal activados por ligando comparten una secuencia genética de entre el 10 y el 20%, también cuentan con una distribución similar en los segmentos membranales hidrofóbicos e hidrofílicos, por lo que se asume que tienen una estructura similar (Chebib, 2004). Los receptores  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_C$  tienen en común que son canales que permiten el paso del ión cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y que regulan la inhibición sináptica rápida. Ambos receptores son pentámeros, es decir están formados por 5 subunidades, cada una de ellas con cuatro dominios transmembranales (TM), de quienes se sabe el TM2 contribuye significativamente con la función de receptor en esta familia. Dicho dominio está configurado en forma de una  $\alpha$ -hélice, formando la pared del poro, por lo que es central en el flujo iónico (Johnston et al., 2003). En cuanto a sus diferencias,  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_C$  tienen características bioquímicas, farmacológicas y fisiológicas particulares, que no sólo se deben a los sitios de unión, sino también a diferencias en la apertura de canal. Se sabe que el canal de los receptores  $\text{GABA}_C$  es más grande, y su apertura se desensibiliza con más dificultad de con la que se activa, así como

también se cierra más lentamente que en los GABA<sub>A</sub>, de la misma forma el GABA es más potente al activar a los receptores GABA<sub>C</sub> que a los GABA<sub>A</sub> (Feigenspan et al., 1993; Feigenspan y Bormann, 1994a).

Los receptores GABA<sub>A</sub> son pentámeros hetero-oligoméricos que combinan hasta 19 tipos de subunidades ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-4,  $\gamma$  1-6,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ), mientras que los GABA<sub>C</sub> son homooligómeros funcionales constituidos exclusivamente de subunidades  $\rho$  (1-3) (Johnston et al., 2003). Otra característica importante es su distinta localización cromosómica y la gran diferencia que existe en su especificidad por distintos tipos de fármacos.

### **2.3.3 Agonistas y antagonistas**

Aunque se han desarrollado una gran variedad de fármacos que actúan sobre los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (*Tabla no.1*) fué difícil disponer de agonistas y antagonistas selectivos para cada uno de ellos. Sin embargo, se ha encontrado que la bicuculina, un antagonista para los receptores GABA<sub>A</sub> no tiene ningún efecto sobre la actividad de los receptores GABA<sub>C</sub>. De hecho, ésta es la distinción farmacológica fundamental entre ambos receptores (Johnston et al., 1975). Por ello, el ácido cis-4-aminocrotónico (CACA), un análogo de GABA diseñado para activar a los receptores GABA<sub>A</sub>, fue considerado como un “perturbador de la paz”, cuando la bicuculina no logró bloquear su acción, fue entonces cuando se postuló la existencia de un tercer tipo de receptores GABAérgicos. La nomenclatura para GABA<sub>C</sub> fue aceptada en 1991, al conseguir clonar las subunidades  $\rho$  de la biblioteca de ADN de la retina humana en ovocitos de rana y de comprobar, en estudios en la rata y la perca blanca, que la bicuculina es inefectiva ante la respuesta de GABA y CACA (Cutting et al., 1991; Shimada et al., 1992; Polenzani et al., 1991).

Posteriormente se encontró que el ácido carboxílico (+)-*cis*-2-aminometilciclopropano ((+)-CAMP) (*Tabla No. 1*), se comporta como un agonista GABAérgico que activa totalmente a aquellos receptores que contienen las subunidades  $\rho 1$  y  $\rho 2$  mientras que funciona como agonista parcial de los que tienen subunidades  $\rho 3$ . Es interesante señalar, que mientras algunos agonistas pueden activar al receptor GABA<sub>A</sub>, su acción sobre los receptores GABA<sub>C</sub> es solo parcial como ocurre con la isoguvacina (*Tabla No. 1*). Otros fármacos como el 4,5,6,7-Tetrahidroisoxazolo[5,4-*c*]piridin-3-ol hidrocloreto (THIP) pueden por el contrario, causar reacciones contrarias en uno y en otro tipo de receptor (*Tabla No.1*), o bien actuar como antagonista sobre los tres tipos de receptores GABAérgicos, como es el caso del 4-(aminometil)-2,6-difluorurofenol (*Tabla No.1*).

A pesar de sus acciones pocos de estos fármacos han sido desarrollados o probados con fines clínicos, pero un caso distinto es del Resveratrol, un componente aislado del vino tinto que ha sido patentado, aunque aún se encuentra en fase experimental, para el tratamiento de desordenes cognitivos de aprendizaje y memoria como la demencia tipo Alzheimer (Johnston et al., 2003; Kumar et al., 2007).

Dentro del grupo de los antagonistas destaca el ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-il) metilfosfínico (TPMPA) que fue diseñado específicamente con el objetivo de ser selectivo para bloquear a los receptores GABA<sub>C</sub> (Ragozzino et al., 1996). Aunque no cruza la barrera hematoencefálica, el TPMPA es por lo menos 10 veces más potente para este receptor que para el GABA<sub>A</sub>, y a diferencia de los agonistas completos o de los agonistas parciales tiene la misma afinidad por los receptores naturales y los mutados en ratones “knockout” (Chebib, 2004). Los estudios realizados con TPMPA han podido mostrar la implicación de los receptores GABA<sub>C</sub> en distintos procesos fisiológicos; a nivel celular se les ha

relacionado con la inhibición de la apoptosis inducida por amoniacó en neuronas hipocampales (Yang et al., 2003), así como también en la liberación y regulación de la hormona tirotrópiná en la glándula pituitaria (Boue-Grabot et al., 2000). A nivel conductual, los receptores GABA<sub>C</sub> parecen estar implicados, en la regulación del ciclo sueño-vigilia en ratas, donde al parecer provoca un incremento en la vigilia así como una reducción tanto en el sueño de ondas lentas como en el paradójico (MOR) (Chebib, 2004; Deschaux et al., 2006). Dicho fármaco, se ha utilizado también para demostrar la participación de los receptores GABA<sub>C</sub> en la percepción del dolor, en la memoria y en el aprendizaje (Johnston et al., 2003).

Por último, algunos fármacos son capaces de distinguir entre receptores formados con distintos tipos de subunidades  $\rho$ . El (-)-TAMP o el 2-METIL-TACA, funcionan como agonistas parciales de homolíómeros formados por subunidades  $\rho_1$  y  $\rho_2$  (*Tabla No.1*) pero sólo logran antagonizar o bloquear débilmente a los receptores formados con subunidades  $\rho_3$  (*Tabla No.1*). La separación consistente en las propiedades farmacológicas de los receptores GABA<sub>C</sub> sugiere que las acciones diferenciales de estos agentes son determinadas por la composición molecular de estos (Pan et al., 2005).

### **2.3.4 Moduladores del receptor GABA<sub>C</sub>**

Los receptores GABA<sub>C</sub> parecen ser poco influenciados por agentes que modulan positivamente al receptor GABA<sub>A</sub>. A este respecto, Johnston et.al. (2003) mencionan que dicha falta de acción podría deberse a su estructura homomérica, que por su simpleza ofrece menos oportunidades para la modulación positiva, aunque también existe la posibilidad de un efecto de “tope” (ceiling effect), debido a la alta potencia que tiene el

GABA sobre los receptores GABA<sub>C</sub>. De hecho, se piensa que la conformación compleja de los receptores GABA<sub>A</sub> podría representar una adaptación para incrementar las oportunidades de efectos modulatorios, como una compensación por ser menos sensibles al GABA (Johnston et al, 2003). Estudios con ratones “knockout” para diferentes subunidades  $\rho$  han permitido obtener receptores susceptibles a la modulación positiva con pentobarbital, y hasta con una leve afinidad con benzodiazepinas. Sin embargo, no se ha logrado hacer cambiar el espectro de los fármacos como agonistas o antagonistas de éste receptor (Martinez-Torres y Miledi, 2004; Johnston et al., 2003; Carland et al., 2004).

Por lo que se refiere a los neuroesteroides, hasta la década pasada se creía que no tenían un efecto modulador sobre estos receptores, pero un estudio reciente demostró que ésta aparente insensibilidad resultaba de utilizar altas concentraciones de GABA durante su ensayo (Morris et al., 1999), pues cuando éstas se disminuyeron, se pudo ver tanto potenciación como inhibición en su actividad. De cualquier forma, las concentraciones de neuroesteroides requeridas para modificar la actividad de los receptores GABA<sub>C</sub> son mayores que las requeridas para el mismo propósito en los receptores GABA<sub>A</sub> (Li et al., 2006). A este respecto Li et. al. (2006) han demostrado que enantiómeros como la alopregnanolona ( $3\alpha5\beta$ ) potencian la respuesta de los receptores GABA<sub>C</sub> a bajas concentraciones de GABA, mientras que la pregnanolona ( $3\alpha5\beta$ P) la inhibe; al parecer, según estos autores, existen fuertes similitudes en los requerimientos estructurales para las acciones esteroideas sobre ambos tipos de receptores, como por ejemplo, la necesidad de una configuración  $3\alpha$ . Sin embargo, llama la atención, que mientras los neuroesteroides  $5\beta$ -reducidos logran potenciar la acción de los receptores GABA<sub>A</sub>, bloquean la de los GABA<sub>C</sub> que contienen subunidades  $\rho1$ . Otro descubrimiento interesante, es que los estrógenos, que

no tienen efecto sobre los receptores GABA<sub>A</sub>, bloquean a los GABA<sub>C</sub> que contienen subunidades  $\rho 1$  con cualquiera de las configuraciones examinadas ( $17\alpha$  y  $17\beta$ -estradiol). De la misma manera, los androstendiolos no mostraron alguna actividad, indicando la importancia del anillo  $\alpha$  no saturado en la acción de estos neuroesteroides (Li et al., 2007).

### **2.3.5. Localización y función de los receptores GABA<sub>C</sub> en el SNC**

Hasta el momento se han identificado 2 tipos de subunidades  $\rho$  en la retina del humano, el ratón y el pollo; 3 en la rata, con un subtipo para  $\rho 1$ , y 5 en la perca blanca. La secuencia genética entre las subunidades  $\rho$  del humano y de la rata es homóloga hasta en un 92%, al igual que entre las distintas especies, que es de entre el 60 y el 74% (Chebib, 2004).

Como ya se dijo, estas subunidades forman receptores homoméricos que contienen como su nombre lo indica, un solo tipo de subunidad, aunque existe evidencia de que también forman receptores pseudoheteroméricos, que a pesar de estar formados únicamente por subunidades  $\rho$  contienen subtipos diferentes ( $\rho 1$  y  $\rho 2$ ) (Enz et al., 1999).

Algunos autores han reportado la existencia de receptores GABAérgicos que contienen subunidades  $\rho$  pero cuyas características farmacológicas no corresponden a los GABA<sub>C</sub>. Se cree que en dichos receptores las subunidades  $\rho$  se asocian con algún otro tipo de las subunidades presentes en los receptores GABA<sub>A</sub>. De hecho, existe evidencia para creer que la subunidad  $\rho 1$  se coensambla con las subunidades  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> para formar hetero-oligómeros funcionales (Milligan et al., 2004; Hartmann et al., 2004).

La función del receptor GABA<sub>C</sub> ha sido principalmente estudiada en la retina y en toda la vía visual. En la retina, dicho receptor está fuertemente expresado en los axones de

las células bipolares, donde su activación reduce el paso de información inducido por la luz desde éstas células hacia las neuronas ganglionares (Schlicker et al., 2004).

**Tabla No.1: Función de distintos fármacos y elementos sobre los receptores GABAérgicos**

FÁRMACO	AGONISTA	AG. PARCIAL	ANTA-GONISTA	ANT. PARCIAL	NEUROMOD. POSITIVO	NEUROMOD NEGATIVO
Muscimol	**** G <sub>A</sub>	**** G <sub>C</sub>				
Isoguvacina	** G <sub>A</sub>	** G <sub>C</sub>				
Bicuculina				**** G <sub>A</sub>		
CACA		*** G <sub>C</sub>	* G <sub>A</sub>			
(-)- TAMP		*** G <sub>C</sub> (ρ1,ρ2)	* G <sub>A</sub>		* G <sub>C</sub> (ρ3)	
(+) - TAMP		** G <sub>C</sub> (ρ1,ρ2)	* G <sub>A</sub>			
TACA	*** G <sub>C</sub>	**** G <sub>A</sub>				
2-metil-TACA		*** G <sub>C</sub> (ρ2)	*** G <sub>C</sub> (ρ1)			
(+)- CAMP	*** G <sub>C</sub> (ρ1,ρ2)	** G <sub>C</sub> (ρ3)				
(-)- CAMP			*G <sub>C</sub>			
3-APMPA			** G <sub>C</sub>	*** G <sub>B</sub>		
CGP36742			** G <sub>C</sub>	**** G <sub>B</sub>		
TPMPA			**** G <sub>C</sub>			
THIP		*** G <sub>A</sub>	*** G <sub>C</sub> (ρ3)			
AZA-THIP			*** G <sub>C</sub>			

						( $\rho 1$ ) *****	
ISO-THIP						$G_C$	
P4MPA						$G_C$ $\rho 1, \rho 3 - **$ $\rho 2 - ****$	
<b>FÁRMACO</b>	<b>AGONISTA</b>	<b>AG. PARCIAL</b>	<b>ANTA-GONISTA</b>	<b>ANT. PARCIAL</b>	<b>NEUROMOD. POSITIVO</b>	<b>NEUROMOD NEGATIVO</b>	
PPA			*** $G_C$				
SEPI			*** $G_C$ ( $\rho 1$ )				
4-(AMINOMETIL)- 2-6-DIFLUORURO FENOL			*** $G_C$ ( $\rho 1$ )	* $G_A$	* $G_B$		
RESVERATROL			* $G_C$				
PICROTOXINA				** $G_A$			$G_C$
BENZODIACEPINAS BARBITÚRICOS ETANOL						$G_A$	
LORECLEZOLE						$G_A$	$G_C$ ( $\rho 1$ )
(+)- ROD188						$G_A$	$G_C$
5 $\alpha$ -ESTEROIDES ALOPREGNANOLONA 5 $\alpha$ - THDOC					* $G_C$ ( $\mu M$ )	***** $G_A$ (nM)	
17 $\alpha$ - estradiol							**
17 $\beta$ - estradiol							$G_C$
CA <sup>+</sup>					$G_C$		
*Orden de potencia Zn <sup>2+</sup> >Ni <sup>2+</sup> >Cd <sup>2+</sup> >Co <sup>2+</sup>							$G_C$
Lu <sup>3+</sup> >Eu <sup>3+</sup> >Tb <sup>3+</sup> > Gd <sup>3+</sup> >Er <sup>3+</sup> >Nd <sup>3+</sup> > La <sup>3+</sup> >Ce <sup>3+</sup>					$G_C$		

(G<sub>A</sub>= receptores GABA<sub>A</sub>, G<sub>B</sub>= receptores GABA<sub>B</sub>, G<sub>C</sub>= receptores GABA<sub>C</sub>); los asteriscos (\*) muestran el grado de potencia de cada fármaco, datos tomados de Johnston et al., 2003 y Li et al., 2007).

En la capa superficial de los colículos superiores, estos receptores están selectivamente expresados en interneuronas GABAérgicas locales y su activación inhibe a las neuronas de proyección. De la misma forma en el núcleo geniculado lateral los resultados de Schlicker et.al. (2004), indican que los receptores GABA<sub>C</sub> están presentes en interneuronas en donde su activación contribuye con más del 25% de las corrientes inhibitorias observadas en esta región.

Fuera de la vía visual, los receptores GABA<sub>C</sub> han sido localizados en el sistema nervioso periférico dentro de la glándula pituitaria, el intestino y los ganglios de la raíz dorsal. Dentro del SNC, los receptores GABA<sub>C</sub> se han encontrado en el tallo cerebral, el hipocampo, la amígdala, el bulbo olfatorio, el tálamo y el cerebelo, en particular en células en cesta y de Purkinje (Johnston et al., 2003; Chebib, 2004).

Dentro del hipocampo tanto receptores GABA<sub>C</sub> funcionales como su RNAm son expresados en el área CA1 de la rata adulta (Alakuijala et al., 2006). Existen datos que sugieren que tanto las subunidades ρ1 como ρ2 están presentes en las capas de células piramidales del hipocampo de ratas neonatos, aunque predomina la subunidad ρ2 en una proporción del 85%. Es interesante que mientras los niveles de la subunidad ρ2 disminuyen con la edad en éstas neuronas, persiste su expresión en interneuronas (Hartmann et al., 2004; Alakuijala et al., 2005).

La expresión y localización de la subunidad ρ1 ha sido estudiada, mediante técnicas de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), así como por

procedimientos inmunohistoquímicos y de microscopia de alto poder en el bulbo olfatorio de la rata. Los estudios realizados revelaron la presencia de esta subunidad tanto en la capa del nervio olfativo (ONL) como en la capa de células mitrales, lo que sugiere que estos receptores están involucrados en el procesamiento de las señales sensoriales olfativas (Chen et al., 2007); en este estudio se comparó la sensibilidad del olfato entre ratones “knockout” para la subunidad  $\rho 1$  y ratones silvestres; los resultados indicaron que los receptores  $GABA_C$  juegan un importante papel en la modulación de las funciones olfativas *in vivo*.

Por su lado, López-Chávez et.al. (2005) se dieron a la tarea de estudiar en el cerebro bovino, la distribución de las subunidades  $\rho 1$  y  $\rho 2$  encontrándolas en algunas áreas donde no se habían descrito previamente. De acuerdo con ellos, estas subunidades están presentes en el núcleo caudado, el cuerpo caloso, el bulbo raquídeo y el puente de Varolio. Sus estudios, indicaron así mismo, que en el núcleo caudado podrían existir, diversas variantes de la subunidad  $\rho 1$  y concluyen que dichas subunidades forman receptores homooligoméricos enteramente funcionales cuando son expresados en ovocitos de rana. Por último, basados en sus estudios de hibridación *in situ*, sugieren que existe transcripción del RNAm para la subunidad  $\rho 1$  en las células de Purkinje y las de Golgi en la corteza cerebelar.

En la amígdala de la rata, y más concretamente dentro del núcleo central (CeA), Delaney y Sah (2001), mediante el uso de registros de patch-clamp (fijación de voltaje) de una sola célula, sugieren la presencia de dos tipos de receptores ionotrópicos inhibitorios. Sus datos indican, que las neuronas de la división lateral del CeA reciben dos aferencias inhibitorias de naturaleza GABAérgica. La primera de ellas, proviene de las islas intercaladas paracapsulares (Ip) y al parecer activa receptores GABA A y C localizados en

las dendritas de las neuronas de esta localidad, pues en sus registros se observa un bajo tiempo de repolarización y los efectos se bloquean parcialmente con bicuculina (antagonista de GABA<sub>A</sub>) y TPMPA (antagonista de GABA<sub>C</sub>). La segunda, se origina en alguna porción localizada más medialmente dentro la amígdala y el GABA que se libera de ella actúa exclusivamente sobre receptores GABA<sub>A</sub> somáticos, pues sus efectos son completamente bloqueados por la bicuculina pero no por el TPMPA. Estos resultados sugieren que el procesamiento de la información entre las fases de entrada y salida de la amígdala puede ser modulado diferencialmente por la actividad de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> (Delaney y Sah, 1999; Delaney y Sah, 2001).

De entre las pocas referencias a las funciones conductuales de estos receptores, se encuentra la de Gibbs y Jonhston (2005) quienes recientemente encontraron una relación entre receptores GABA<sub>C</sub> y la memoria a corto plazo, sus resultados muestran que con una dosis baja de GABA (0.01 a 3 pmoles por hemisferio), se inhibe fuertemente el reforzamiento de la memoria en una tarea de aprendizaje aversivo al gusto, misma que al aplicar bicuculina no presenta cambios significativos, pero no así con el ácido (piperidina-4-il) metilfosfínico (P4MPA, antagonista selectivo del receptor GABA<sub>C</sub>), quien logra potenciarla hasta recuperar los niveles control dentro de los 10 min. después del entrenamiento.

Hasta el momento la relación de la ansiedad y los receptores GABA<sub>C</sub> no ha sido definida, pero el dihidrohonokiol-B (DHH-B), un compuesto derivado del honokiol que fue aislado de la corteza del árbol de la magnolia, presenta una importante actividad ansiolítica en distintos paradigmas de ansiedad en animales; además de que, al parecer, este compuesto carece de muchas de las acciones no deseadas de las benzodiazepinas como son la somnolencia, los trastornos del aprendizaje y la memoria y la tolerancia al fármaco o

síndrome de abstinencia, por lo que se observa como un fármaco altamente seguro (Kuribara et al. 2000), que podría estar actuando como agonista de los receptores GABA<sub>C</sub> (Irie et al., 2001).

Por último, cabe señalar que la transfección de subunidades  $\rho$  se ha utilizado como una terapia alternativa a la farmacológica para modificar la excitabilidad neuronal. Mediante este enfoque, las células cerebrales se “infectan” con subunidades  $\rho$ , vía el uso de adenovirus en un intento por modificar la actividad de los receptores GABA<sub>C</sub> existentes en el sitio de la transfección. Bajo estas condiciones, se ha demostrado que en el hipocampo la transfección con subunidades  $\rho$  resulta en la eliminación de la hiperexcitabilidad neuronal inducida experimentalmente y con ello retarda la muerte neuronal inducida por el bloqueo crónico de los receptores a glutamato (Johnston et al., 2003). Con base en estos resultados, se cree que la transfección de subunidades  $\rho$  con el uso de adenovirus tiene altas posibilidades de abrir camino para la terapia genética en el tratamiento de algunos trastornos del SNC como la epilepsia, abriendo la posibilidad de utilizar receptores GABA<sub>C</sub> con distintas mutaciones en sus subunidades para lograr propiedades terapéuticas preferenciales hechas “a la medida” (Filippova et al., 2001).

## **2.4 LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE “+”**

El Laberinto Elevado en Forma de “+” (“Elevated Plus-Maze”), es un paradigma de ansiedad no condicionado, ampliamente utilizado para evaluar las respuestas conductuales que los roedores experimentan en forma innata ante una situación que potencialmente puede atentar en contra de su integridad. Dicho paradigma, comparado con las tareas que

implican condicionamiento, tiene la ventaja de que no involucra estímulos nocivos, como choques eléctricos, para condicionar la ansiedad/miedo así como tampoco emplea procedimientos de privación de agua o comida al animal, lo cual permite evaluar el estado de reactividad fisiológica o “ansiedad” de forma más sencilla.

Tal paradigma descrito inicialmente por Montgomery (1958), fue modificado y validado por Pellow et al., (1985) y consiste en un laberinto elevado del nivel del piso (50 cm) que posee dos brazos abiertos y dos brazos cerrados que se interceptan en un cuadrado central. Dicho modelo explota la aversión natural que sienten los roedores por los espacios abiertos, y por el balanceo en una plataforma relativamente estrecha (10cm) y elevada; por consiguiente se asume que un mayor número de visitas y una cantidad mayor de tiempo en estos espacios denotan un estado de menor ansiedad en las ratas, en comparación con los controles. Aunque inicialmente se supuso que la altura del laberinto era importante, estudios posteriores indicaron que la aversión de los roedores a este laberinto no se da a su situación elevada sino a sus espacios (brazos) abiertos.

En sus estudios Pellow et al. (1985) mostraron que las ratas (estudiaron las razas Hooded y Wistar), bajo condiciones normales, prefieren visitar y permanecer más tiempo en los brazos cerrados del laberinto, pero que bajo condiciones de baja ansiedad los animales tienden a explorar por más tiempo los espacios abiertos de éste. En cuanto al tiempo que tardan en entrar por primera vez a cualquiera de los brazos (latencia), no parece existir una tendencia consistente hacia la entrada inicial a los brazos abiertos o cerrados del laberinto. Parece ser, que en ausencia de algún tratamiento ni la novedad, ni la iluminación, son determinantes del comportamiento de los animales en el laberinto, pues las ratas no mostraron cambios en su conducta dentro del laberinto al repetir la prueba tres días después y tampoco cuando la prueba se realizó bajo condiciones de luminosidad semejantes en

ambos brazos (Pellow et al., 1985). Sin embargo estudios posteriores realizados en varios laboratorios mostraron que el diazepam deja de tener efectos ansiolíticos en este paradigma cuando la prueba se realiza 24 horas después (File et al., 1993) y que esta disminución del efecto va acompañada de cambios en el receptor GABA<sub>A</sub> (Albrechet-Souza et al., 2008).

La preferencia de las ratas por los brazos cerrados está determinada entonces por la aversión incondicionada, que como se mencionó antes, los animales sienten de forma natural por los espacios abiertos del laberinto, así como por la característica etológica que los roedores evidencian para permanecer en contacto con superficies de objetos inanimados (tigmotaxia). Sorprendentemente, el patrón de exploración del laberinto no presenta habituación al paso del tiempo como lo demuestran las pruebas de test-retest (Pellow et al., 1985). Desde el punto de vista fisiológico y de acuerdo con lo anterior es importante señalar que las concentraciones de corticosterona en plasma están elevadas en las ratas a las que se les obliga a permanecer en los brazos abiertos del laberinto (Pellow et al., 1985), o cuando simplemente se les somete a esta prueba (File et al., 1994).

Dado que la conducta de los roedores en el laberinto elevado en forma de “+” es de tipo exploratorio, la interpretación de los resultados en los experimentos que lo utilizan depende de que la condición experimental usada no modifique su actividad locomotora. Sólo si no hay cambios en ésta se puede asumir por tanto, que una modificación en la actividad exploratoria (visitas, tiempo) del animal en los brazos abiertos del laberinto está relacionada con cambios en su nivel de ansiedad. Así, un falso positivo podría resultar del incremento de la distancia recorrida por los animales debido a los efectos de estimulación motriz de algunas drogas como las anfetaminas. De la misma forma, los fármacos sedantes, pueden parecer ansiolíticos, pero el decremento en el tiempo de exploración es debido a

que la actividad motriz del animal esta disminuida y le impide explorar el laberinto (Dawson et al, 1995).

Con la finalidad de obtener una medida de la actividad locomotora, los animales usados son sujetos a una prueba de locomoción (ejemplo, “campo abierto”) antes o después de explorar el laberinto, distinguiéndose si los cambios observados representan modificaciones genuinas en la exploración del laberinto o si surgen como consecuencia de cambios en su actividad locomotriz. Los estudios piloto muestran que el poner a los animales antes del laberinto en un ambiente nuevo tiende a incrementar toda la actividad y con ello la probabilidad de que los brazos abiertos sean explorados, razón por la cual esta prueba sigue al laberinto (Pellow et al, 1985).

Por otro lado, es interesante señalar que el número de entradas totales a los brazos abiertos más las de los cerrados, representa una medida de locomoción en ésta y que correlaciona la mayor parte de las veces con la locomoción de los animales medida en la prueba de “campo abierto” (Dawson et al., 1995). Los datos sugieren que el tiempo que pasan los roedores en los brazos abiertos es más sensible a los efectos de las drogas que el número de entradas a ellos (Pellow et al., 1985). Dado que el número de entradas a los brazos abiertos del laberinto pudiera modificarse por el estado locomotor del animal, es conveniente expresar este valor como el porcentaje en relación con el número de entradas totales a ambos brazos (Pellow et al, 1985).

Con la intención de mejorar la confiabilidad del instrumento, se ha propuesto que puede hacerse un análisis más detallado del comportamiento de los roedores en el laberinto. Dicha propuesta, incluye la calificación de conductas que se han interpretado como de evaluación de riesgos potenciales tales como: la inclinación de la cabeza por el borde de los

brazos (head dipping) y el estiramiento hacia adelante para explorar sin mover los pies (elongaciones). Estas acciones pueden tener lugar tanto en los brazos cerrados, donde los animales se sienten protegidos, como en los abiertos por los que experimentan una aversión natural (Dawson et al., 1995).

En conclusión, las ventajas de este instrumento son muchas, pues es una prueba rápida y simple que no utiliza equipo costoso ni complicado y no se necesita de mayor capacitación. El modelo, está basado en un comportamiento espontáneo que no necesita entrenamiento y no utiliza estímulos nocivos o privación de alimento. Es útil para identificar efectos ansiolíticos de drogas como las benzodiazepinas tanto después de tratamientos agudos como crónicos y también para observar efectos sobre la ansiedad en ambas direcciones sin necesidad de hacer ninguna modificación adicional. Sus desventajas tienen que ver con la posible confusión con los cambios en la actividad locomotriz de los animales y con el hecho de que la ansiedad basal de los animales, pueden cambiar diariamente y estar expuesta a variables ambientales o fisiológicas, sin embargo, todas estas desventajas son controlables mediante las pruebas de locomoción y procedimientos de control como los balanceos y la habituación de los animales tanto al experimentador como a los procedimientos de microinyección (Pellow et al., 1985).

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 JUSTIFICACIÓN**

La ansiedad es uno de los estados o funciones más complejas del SNC y más importantes para los individuos. Por desgracia, dada su complejidad, es una de las funciones más sensibles a sufrir desequilibrios y patologías a consecuencia de causas muy diversas. No es sorprendente entonces, que hasta el momento, alrededor del mundo se haya desarrollado un gran trabajo de investigación en torno a ella y a la forma en como se genera, desde aspectos moleculares, hasta los cognitivos y conductuales. A partir de estos estudios, sabemos la importancia, tanto del sistema GABAérgico como de la amígdala en los procesos que modulan la ansiedad, pero desconocemos si el receptor GABA<sub>C</sub>, que posee propiedades *sui generis*, pudiera jugar un papel importante en la modulación de la ansiedad por parte de la amígdala.

Por esta razón, en éste trabajo de tesis se pretende explorar en la rata, la posibilidad de que dichos receptores existan en la amígdala y participen en la modulación de la ansiedad utilizando para ello herramientas conductuales y farmacológicas. De existir esta posibilidad, nuestro estudio abrirá una nueva estrategia para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos de ansiedad.

### **3.2. HIPÓTESIS:**

Con base en los antecedentes previamente descritos, donde se demuestra que el receptor GABA<sub>C</sub> existe dentro de distintas estructuras cerebrales, incluyendo al estriado y al sistema olfativo y tomando en cuenta que los sistemas de neurotransmisión GABAérgicos tienen una importante modulación sobre los mecanismos de la ansiedad, se **postula que los receptores GABA<sub>C</sub> están presentes en la amígdala del lóbulo temporal y que su bloqueo generará conductas de ansiedad evaluadas a través del laberinto elevado en forma de “+”.**

### **3.3 OBJETIVOS:**

- 1.- Determinar por medios conductuales la posible existencia del receptor GABA<sub>C</sub> en la amígdala del lóbulo temporal de la rata.
- 2.- Identificar el papel ansiogénico o ansiolítico de los receptores GABA<sub>C</sub> dentro de la amígdala.
- 3.- Comparar el papel de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> amigdalinos en la modulación de la ansiedad.

### **3.4 VARIABLES**

Al definir nuestras variables es imprescindible unificar criterios en torno al concepto de ansiedad. Dentro de este trabajo la ansiedad se entiende como una conducta que en sus formas extremas puede tener dos expresiones básicas, una caracterizada por la intención frenética de huida, y otra por la de enfrentar el conflicto que la provoca. En el modelo a

utilizar, la rata, en forma instintiva, evitará la entrada y permanencia en los brazos abiertos del laberinto.

**La Variable dependiente** dentro de este estudio es el nivel de ansiedad en el animal, expresado por el número de visitas a los distintos compartimentos del laberinto y el tiempo de permanencia en ellos, mientras que **la variable independiente** está dada por las diferentes dosis y acciones de los fármaco utilizados.

### **3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para obtener validez tanto interna como externa en los experimentos se utilizó un diseño univariable con 4 niveles. Organizado como un diseño de grupos independientes, sólo posprueba con la forma 5 x 2. En otras palabras, se seleccionaron muestras al azar y éstas a su vez se asignaron aleatoriamente a cada uno de los tratamientos (dos fármacos con cuatro dosis diferentes cada uno, más un grupo control para cada fármaco) y la prueba sólo se aplicó al concluir el tratamiento. Para evitar los sesgos producidos por el experimentador se utilizó un procedimiento ciego, y para tener una mayor congruencia en las variables introducidas inadvertidamente en el experimento y en su análisis, todos los experimentos fueron realizados por la misma persona.

### **3.6 SUJETOS, CONTEXTO Y ESCENARIOS:**

Se utilizaron alrededor de 270 ratas macho de la cepa Wistar de entre 245 a 260gr. de peso al día de la cirugía, de las cuales sólo se tomaron en cuenta 123 para el análisis estadístico. Todos los animales fueron provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Los animales fueron retirados de dicho bioterio, por lo menos un día antes de la cirugía, y colocados en cajas de acrílico en grupos de 5 bajo condiciones de temperatura controlada (22° C) y un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas (luz; 7-19 hrs.). Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Se les administró ambroxol y furaltadona por vía oral (Valsyn Plus, Pisa Agropecuaria), con el fin de controlar o prevenir infecciones antes del proceso quirúrgico. Al terminar la cirugía las ratas se colocaron en cajas individuales y permanecieron así durante el proceso de habituación al experimentador y hasta el término del experimento. Los experimentos se realizaron en una habitación aislada del ruido exterior, equipada con las condiciones necesarias de iluminación así como también para el registro por videograbación. En todas las ocasiones tanto la habituación como cada uno de los experimentos se llevó a cabo entre las 9 y las 16 horas.

### **3.7. CIRUGÍA**

Para la implantación de las cánulas guía (Plastic One mod. C315G; longitud 26 gauge; grosor interno 0.24mm, Roanoke, USA), los animales se anestesiaron con clorhidrato de ketamina (160mg/Kg i.p., Pisa Agropecuaria). Para lograr una mayor anestesia, previo a la incisión se aplicó en forma local un spray de lidocaína al 10% (Xylocaina Spray, Astra Zeneca, México). Una vez anestesiados los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico (KOPF Instruments, Tujunga California) con la barra incisiva a -3.3mm. Las coordenadas utilizadas fueron: AP: -1.7mm, L:  $\pm$  4.7mm, V: -7.7mm. con referencia al bregma acorde con el atlas de Paxinos y Watson (1998). Las cánulas guía fueron fijadas al cráneo con tres tornillos de acero inoxidable y acrílico dental rápido (Acrimín Autocurable, Laboratorios Arias, México), así mismo y con el fin de

asegurar la permeabilidad de las cánulas se les introdujo un “mandril” (Dummy Cannulae Plastic One Mod. C315DC). Al termino de la cirugía se administró un antibiótico (Fortabencil L.A. 10,000 U.I./Kg. Fort Dodge Animal Health, México) de forma preventiva.

### **3.8 APARATOS:**

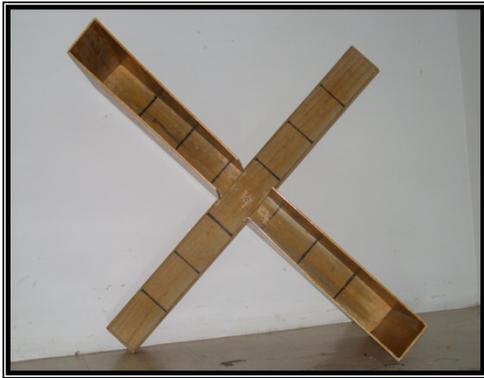
#### **3.8.1 Laberinto elevado en forma de “+”.**

El laberinto fue construido de madera de acuerdo a Pellow et al. (1985) y posee cuatro brazos, dos de ellos abiertos (50 x 10cm) y dos cerrados (50 x 10 x 40cm) con la parte superior abierta. Los cuatro brazos se interceptan en un cuadrado central (10 x 10cm). El laberinto se encuentra elevado sobre una base de madera a una altura de 50cm del suelo (*Figura No. 8*). La luz durante el experimento es controlada a una intensidad de entre 2.3 a 2.5 luxes.

#### **3.8.2 Campo abierto**

Consiste en una superficie blanca y cuadrada de 50 x 50 cm, con paredes de acrílico transparente de 30cm de altura (*Figura No. 9*), mismas que soportan un marco metálico que a su vez, contiene a los sensores de locomoción. La luz durante la prueba es controlada a una intensidad de 175 luxes. La locomoción de los animales se monitoreó a través de sensores de luz dispuestos a cada 5 centímetros de los cuatro extremos del marco metálico (Marco “X-Y”); dichos sensores constan de los emisores en un extremo y los receptores en el extremo opuesto. El registro de locomoción (1 Omni-Alva / AOBioMed, México)

mediante un sistema de registro de coordenadas con 10 posibles posiciones en el eje “X” y la misma cantidad para el eje “Y”, nos permite conocer la posición del sujeto. Durante el experimento, el sistema registra cada coordenada con una resolución de 200 milésimas de segundo. El sistema esta diseñado para permitir el registro de hasta cinco minutos a partir del inicio del programa.



*Figura No. 8 Laberinto Elevado en forma de “+”.* Consta de cuatro brazos, dos abiertos (50 x 10 cm.) y dos cerrados (50 x 10 x 40 cm.) que se interceptan en un cuadrado central, cuenta con una elevación de 50cm. se espera que entre más ansiedad contengan los animales, evitarán más la entrada a los brazos abiertos.



*Figura No. 9 Prueba de Campo Abierto.* Consta de una plataforma dividida en 16 cuadros. El número de veces que el animal cruza alguno de ellos sirve como medida de actividad locomotriz. Con esto se logra distinguir si los efectos del laberinto son debidos a la ansiedad o a alguna alteración en la actividad locomotriz.

### **3.9 PROCEDIMIENTO:**

Después de la cirugía, las ratas permanecieron bajo un período de recuperación de 4 a 7 días. Tres días antes del experimento los animales fueron manipulados durante 5 minutos por cada día, con el fin de habituarlos tanto al proceso de microinyección como al experimentador. Un día antes del experimento las ratas fueron llevadas al cuarto experimental y permanecieron en él durante toda la noche manteniendo las condiciones de luz y temperatura controladas en un intento por mantener una línea base de ansiedad en el nivel más bajo posible.

Cada sesión experimental contaba con alrededor de 12 sujetos mismos a los que se les asignaba de forma aleatoria la administración de las soluciones, a las cuales el experimentador era ciego; con esto se logró un balanceo en el cual los sujetos fueron

asignados a cada grupo de manera aleatoria y fueron inyectados a distintas horas y distintos turnos dentro de cada sesión experimental.

Los fármacos utilizados para los grupos experimentales fueron el hidrato de ácido (1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-il) metilfosfínico (Sigma-Aldrich México) y metayoduro de bicucullina (Sigma-Aldrich México) ambos diluidos en solución salina fisiológica (SSF) misma que fué aplicada para los grupos control. Los grupos se conformaron de la siguiente forma:

- Cuatro grupos con dosis distintas de TPMPA más el grupo control. N total = 53
  - 6 pmoles /250nl por lado N= 10
  - 60 pmoles /250nl por lado N= 12
  - 240 pmoles /250nl por lado N= 10
  - 800 pmoles/250nl) por lado N= 10
  - SSF 250nl por lado N= 11
  
- Cuatro grupos con dosis distintas de bicuculina más el grupo control. N total = 70
  - 1.8 pmoles /250nl por lado N= 9
  - 6 pmoles /250nl por lado N=10
  - 16 pmoles /250nl por lado N=12
  - 60 pmoles/250nl por lado N=19
  - SSF 250nl por lado N=20

| Las microinyecciones se hicieron en un volumen de 250nl que se pasaron a los largo de 5 minutos mediante una bomba de microinyección (mod.CMA/100, CMA/microdialysis, Estocolmo, Suecia), este tiempo asegura que el área de difusión sea lo más reducida posible. Datos previos indican que la microinyección intramigdalina bajo las

mismas condiciones experimentales limitan el área de difusión del fármaco a un volumen promedio de  $1.01 \pm 0.45 \text{ mm}^3$  (perez de la mora 2006). Para realizar dichas microinyecciones se introdujo en la cánula guía un inyector (Plastic One, Mod. C3151; longitud – 33 gauges; grosor interno - 10mm) cuya punta sobresalía 1mm de la cánula guía. Los inyectores se mantuvieron dentro de la cánula por un minuto más después de que la bomba concluyera la microinyección, con el fin de asegurar que la sustancia difundiera de su sitio de inyección y también para evitar su flujo reverso.

Al terminar el proceso de microinyección, cada sujeto se colocó en el cuadro central del laberinto con la cara dirigida hacia alguno de los brazos abiertos y su conducta fue registrada durante cinco minutos mediante el uso de una cámara de video colocada encima del laberinto. Al término de la prueba, los animales fueron colocados en el dispositivo usado para el campo abierto en el cual se registró su actividad locomotriz por 5 minutos. Al término del experimento las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (50mg/kg i.p., Pisa Agropecuaria) inyectándoseles a través de las cánulas con anterioridad a su muerte 250nl de azul de pontamina (Pontamine sky blue Sigma Chemical Co., St Louis, USA) disuelto en SSF para facilitar la localización histológica de los sitios de inyección.

Para determinar la posición de las cánulas los animales fueron decapitados y sus cerebros sumergidos en una solución de formaldehído al 10% (J.T. Baxter, México). Dicha posición fue verificada en secciones coronales de tejido cerebral de cada sujeto de 50 micras de espesor obtenidas mediante un crióstato (CM1510-3, Leica Instruments Nussloch, Alemania). La tinción de las rebanadas fue realizada con la técnica de Nissl. Sólo los animales en los que las puntas de ambas cánulas estaban localizadas en la amígdala y al

menos una de ellas estaba localizada en la cercanía de las islas intercaladas paracapsulares fueron incluidos en este estudio.

### **3.10 EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA**

Haciendo uso de los videos obtenidos de cada sujeto experimental se evaluó el número de veces que los animales entran a cada tipo de brazo del laberinto y el tiempo que permanecen en ellos. Como medidas de ansiedad se tomaron: el número de entradas a los brazos abiertos o cerrados del laberinto, expresadas como porcentaje del número de entradas totales a los brazos abiertos más cerrados del dispositivo durante la prueba y el tiempo de permanencia en cada tipo de brazo, expresado también como porcentaje del tiempo total gastado en ambos tipos de brazos. La locomoción dentro del laberinto se tomó como el número de entradas totales a los cuatro brazos.

La prueba de campo abierto se evaluó a través del número de eventos emitidos por el software ya mencionado. Cada evento expresa que el sujeto cruzó por alguna de las coordenadas registradas por los sensores de locomoción. (ver sección 3.8)

#### **3.1.1 ANÁLISIS DE LOS DATOS**

Dada la variabilidad inherente al uso de paradigmas no condicionados, como el utilizado en este estudio, los resultados son expresados en forma de medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (25 y 75). Para la evaluación estadística de los resultados, dado que la población bajo estudio sigue una distribución normal y todos los datos pasan la prueba de homogeneidad de varianzas, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida, cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p <$

0.05), de la prueba *Post Hoc* de Dunnett, que compara los distintos grupos experimentales en contra del control. En todos los casos, el nivel de significancia estadística se tomó como  $\alpha < 0.05$ . Los parámetros estadísticos usados fueron computados mediante el uso del paquete estadístico GraphPad Prisma 4.

## **4.RESULTADOS**

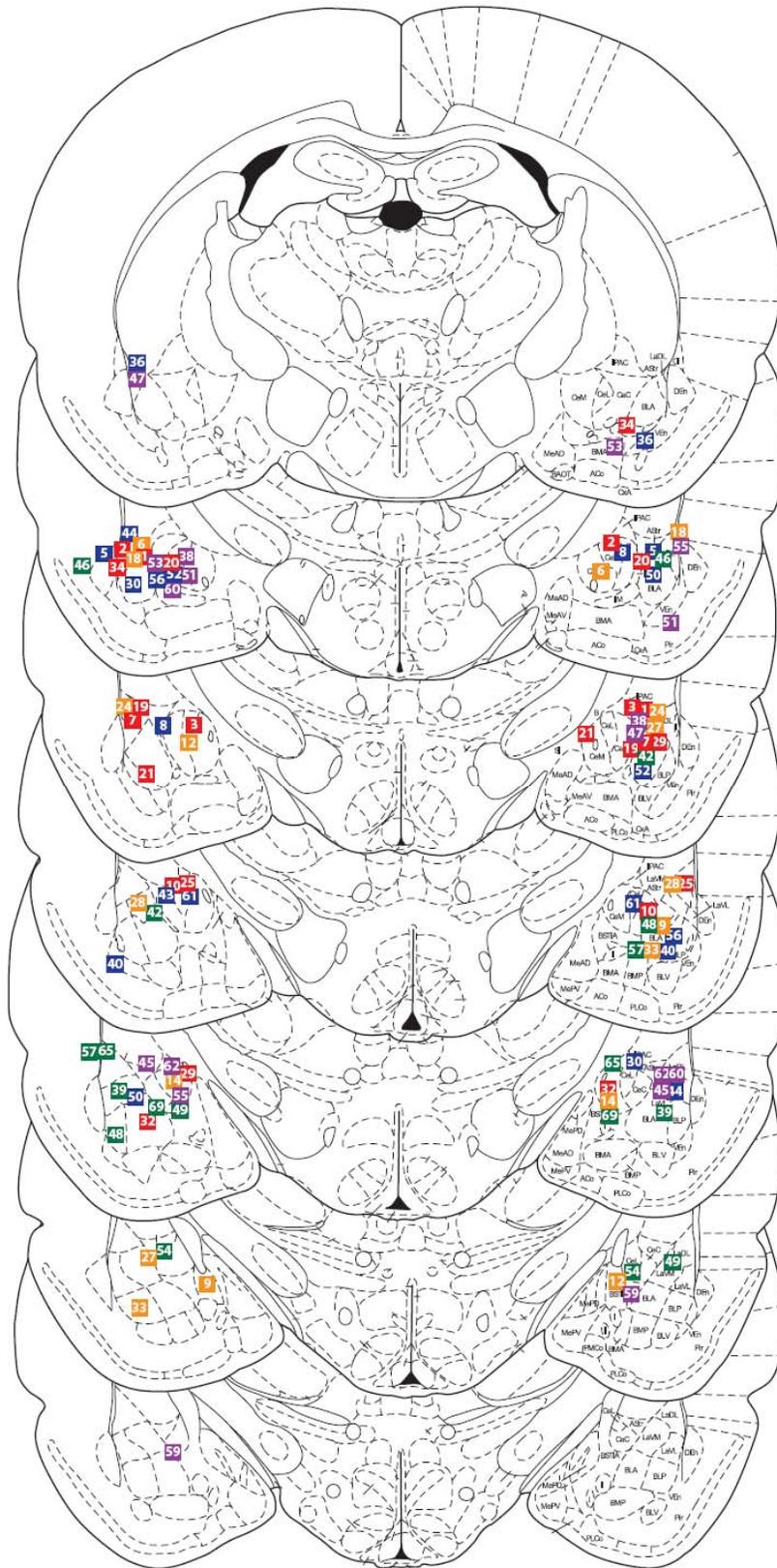
### **4.1 Histología**

Con el objetivo de localizar la posición de las puntas de las cánulas se tomaron secciones coronales de 50 micras del cerebro de cada uno de los sujetos. Sólo los animales en los que las puntas de ambas cánulas estaban localizadas en la amígdala y al menos una de ellas estaba localizada en la cercanía de las islas intercaladas paracapsulares fueron incluidos en este estudio.

Como se observa en la *Figura No. 10 (A)* la mayor parte de las puntas de las cánulas utilizadas en los experimentos con TPMPA se encontraron entre el bregma  $-2.12$  y  $-2.80$  mm y sólo unas pocas se encontraron en niveles más anteriores o posteriores con respecto al bregma. No se encontró ninguna punta de cánula en posiciones anteriores a bregma  $-1.8$  mm ni posteriores a bregma  $-3.30$  mm. Una distribución similar fue encontrada en los experimentos en los que se inyectó bicuculina (*Figura No. 10 (B)*), aunque en algunos pocos casos se encontraron puntas de cánulas situadas a nivel de bregma  $-1.4$ mm y bregma  $-3.6$ mm. Como puede observarse, la mayoría de las cánulas estuvieron localizadas bilateralmente sobre los núcleos central (CeA) y basolateral (BLA) de la amígdala, en cercanía de la porción rostrolateral de la isla intercalada principal y de las islas intercaladas paracapsulares mediales. Ninguna cánula estuvo localizada en la cercanía del núcleo medial ni sobre las regiones corticales de la amígdala.

*Figura No. 10 (A) TPMPA*

- SSF
- 6 pmoles
- 60 pmoles
- 240 pmoles
- 800 pmoles



Bregma -1.80 mm

Bregma -2.12 mm

Bregma -2.30 mm

Bregma -2.56 mm

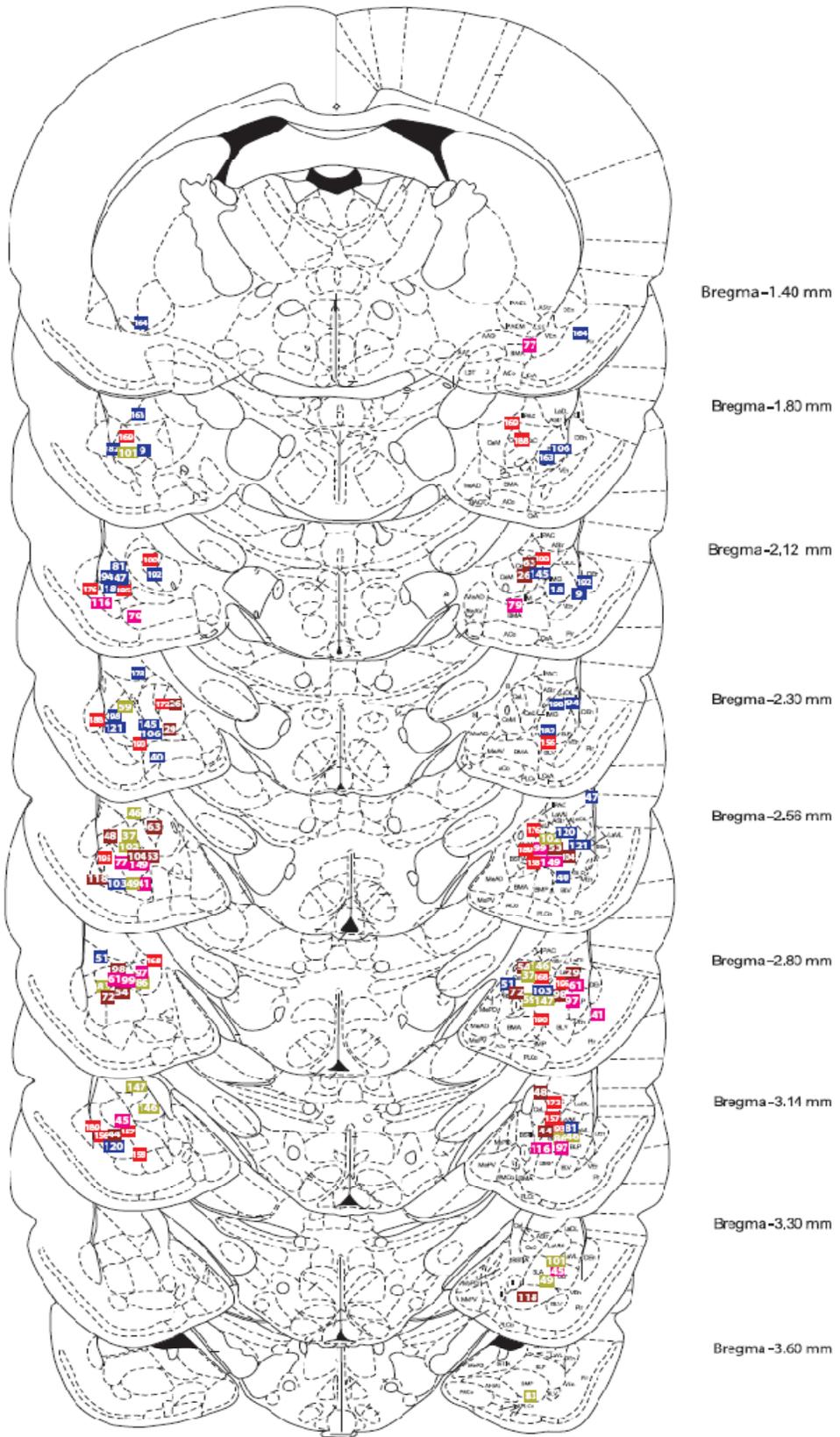
Bregma -2.80 mm

Bregma -3.14 mm

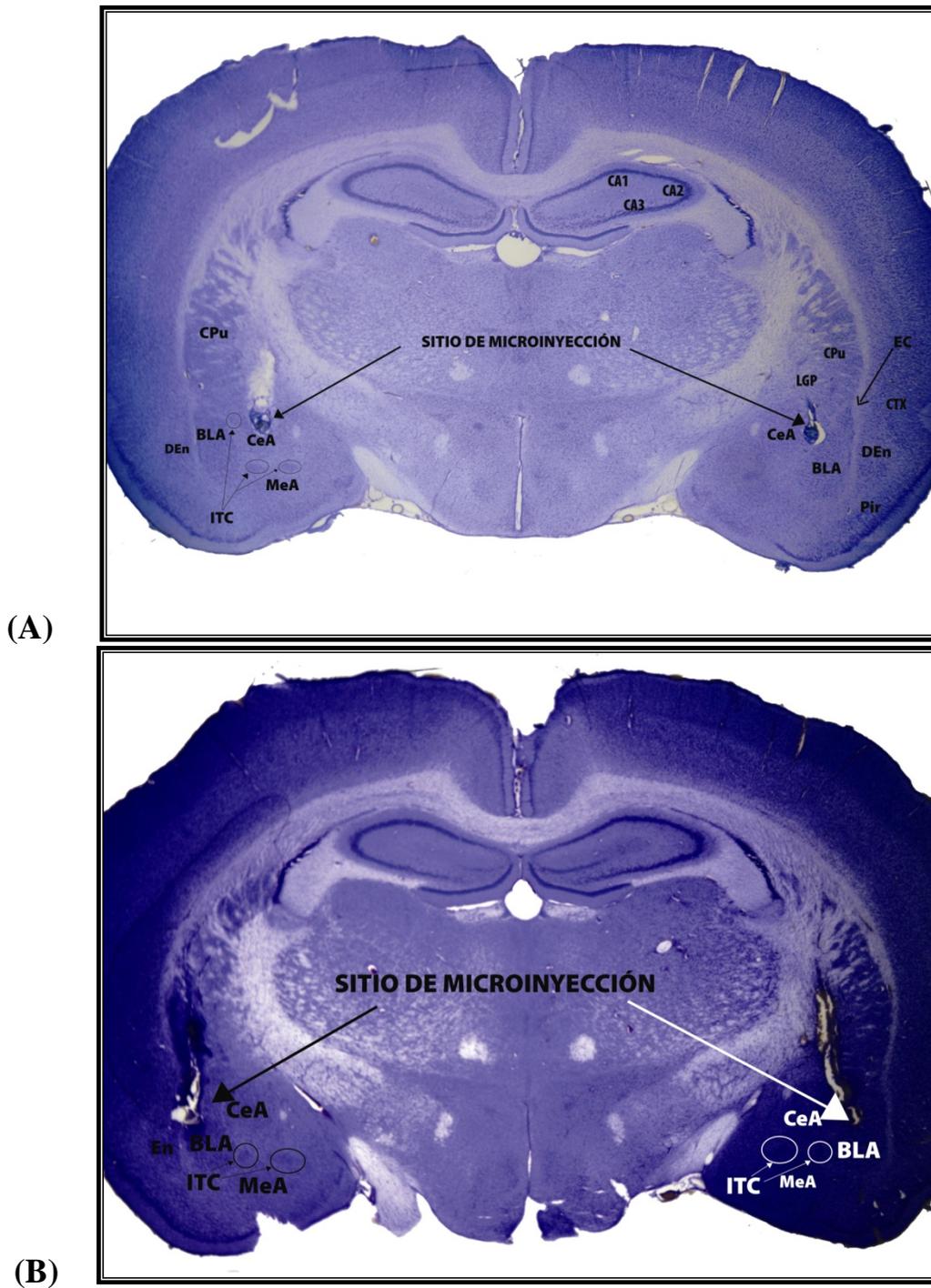
Bregma -3.30 mm

*Figura No. 10 (B) bicuculina*

Figura No. 10 Representación esquemática en la que se muestran la localización de las puntas de las cánulas dentro de la amígdala en los experimentos en los que se microinyectó TPMPA (A) y bicuculina (B). En la figura, cada color corresponde a una dosis inyectada. Los números dentro de las figuras se refieren al número de identificación del animal cuya cánula se indica. Las secciones de la amígdala fueron tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos & Watson (1998).



● SSF    ● 1.3 pmoles    ● 6 pmoles    ● 16 pmoles    ● 60 pmoles



**Figura No. 11 Trayecto y la localización de las puntas de las cánulas.** Nótese que a lo largo del trayecto de las cánulas no se observan signos de inflamación y hemorragia. Identifique en las microfotografías la localización de los núcleos central (CeA) y basolateral (BLA), así como el del espacio paracapsular en el que se encuentran situadas las islas intercaladas paracapsulares y observe que las puntas de las cánulas se encuentran localizadas en estos ejemplos en (A) el núcleo central y el espacio paracapsular y en (B) el núcleo basolateral a ambos lados de la sección. Microfotografías Representativas de segmentos coronales a nivel de -2.30mm acorde con el atlas de Paxinos y Watson (1998).

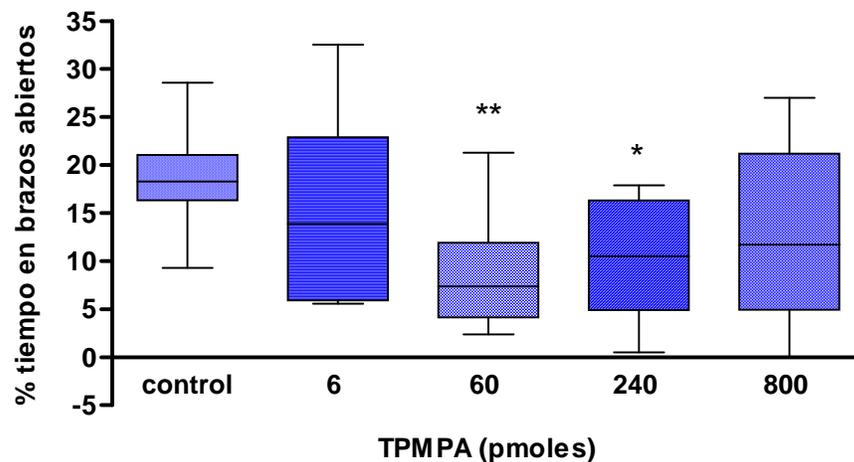
## **4.2 Efecto de la administración bilateral intramigdalina de TPMPA y bicuculina sobre el nivel de excitabilidad.**

No se presentaron convulsiones “clínicas” en ninguno de los 53 animales tratados con TPMPA. Sin embargo, la administración bilateral de bicuculina sólo en la dosis más alta (60 pmoles/250nl por lado) provocó la aparición de convulsiones clínicas en 4 de las 29 ratas expuestas a ésta dosis. Dichos animales no fueron incluidos en el análisis conductual en el laberinto elevado en forma de “+”. Deafortundamente, y debido a la falta de registros electrofisiológicos no podemos descartar la posibilidad de focos o espigas epilépticas en ninguno de los casos.

## **4.3 Efecto de la microinyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA sobre la conducta de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+”.**

### **Tiempo transcurrido en los brazos abiertos del laberinto**

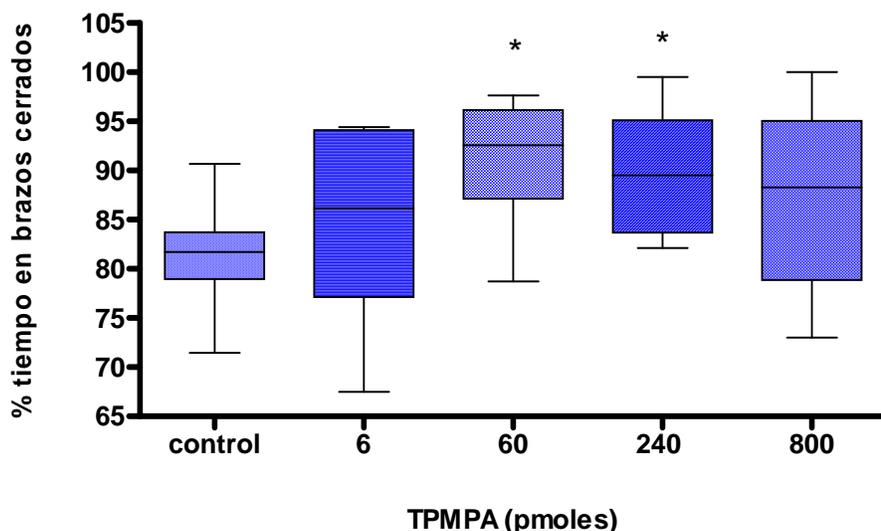
La inyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA (6, 60, 240 y 800 pmoles), justo antes de someter a los sujetos experimentales a la prueba, resultó en un **decremento estadísticamente significativo en el tiempo que estos pasaron en los brazos abiertos del laberinto** ( $F_{(4, 47)} = 3.228$   $P < 0.05$ ; *Gráfica No. 1*). Al comparar a los grupos experimentales contra el grupo control, utilizando la prueba *post hoc* de Dunnett, se encontró que los efectos del TPMPA siguen una especie de “U” siendo estadísticamente significativos únicamente con las dosis intermedias (60 y 240 pmoles/lado).



*Gráfica No. 1.* Efectos de la inyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA, sobre el tiempo que los sujetos permanecen en los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de “+”. La administración bilateral de TPMPA (60 y 240 pmoles por lado) redujo significativamente el tiempo que las ratas permanecen en los brazos abiertos del laberinto. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra. \* P<0.05, \*\*P< 0.01 en relación al grupo control (Prueba de Dunnett).

## Tiempo transcurrido en los brazos cerrados del laberinto

En congruencia con los resultados anteriores, los animales tratados bilateralmente con TPMPA permanecieron por más tiempo en los brazos cerrados del laberinto con respecto al grupo control ( $F_{(4, 47)} = 3.015, P > 0.05$ , *Gráfica No. 2*), siendo éste, como en el caso anterior, un aumento estadísticamente significativo únicamente para los grupos tratados con 60 y 240 pmoles de TPMPA por lado.



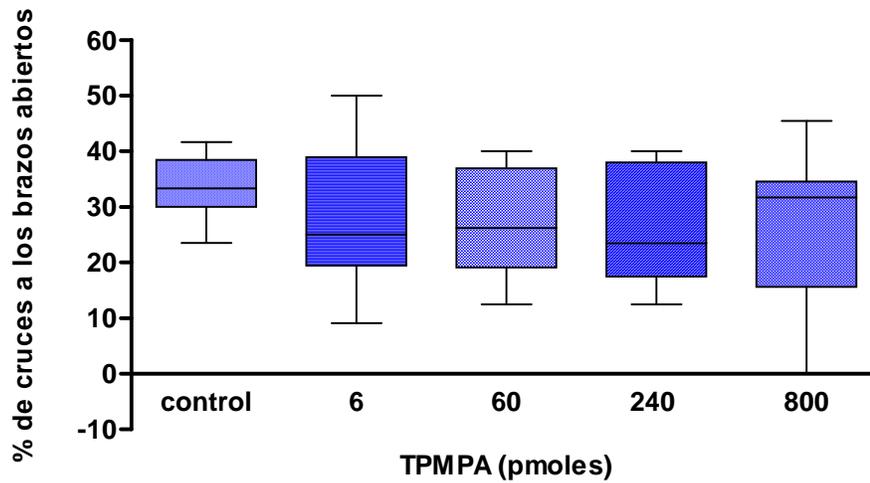
*Gráfica No. 2.* Efectos de la inyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA, sobre el tiempo que los sujetos permanecen en los brazos cerrados del laberinto elevado en forma de “+”. La administración bilateral de TPMPA (60 y 240 pmoles por lado) aumentó significativamente el tiempo que las ratas permanecen en los brazos cerrados del laberinto. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra. \*  $P < 0.05$ , en relación al grupo control (Prueba de Dunnett).

### Visitas a los brazos abiertos

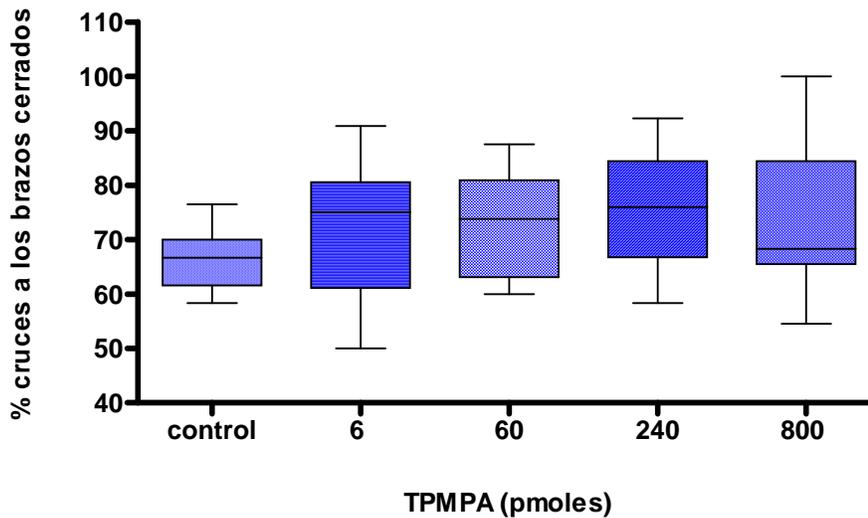
El número de visitas a los brazos abiertos del laberinto expresado como el porcentaje del número de entradas a los brazos abiertos con respecto al número total de entradas a ambos brazos (abiertos + cerrados) de este dispositivo, no se modificó significativamente por la administración intra-amigdalina de TPMPA en ninguna de las dosis administradas con respecto al grupo control ( $F_{(4, 47)} = 0.7256$ ,  $P > 0.05$ , *Gráfica No. 3*).

### Visitas a los brazos cerrados

Como se muestra en la *Gráfica No. 4* en comparación con el grupo control no se observaron cambios en el número de visitas de las ratas a los brazos cerrados del laberinto tras la administración intra-amigdalina de las mismas dosis de TPMPA ( $F_{(4, 47)} = 1.025$ ,  $P > 0.05$ ).



*Gráfica No. 3.* Efectos de la inyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA sobre el número de visitas a los brazos abiertos del laberinto. Ninguna de las dosis probadas provocó cambios significativos. visitas a brazos abiertos + cerrados = 100 %. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.



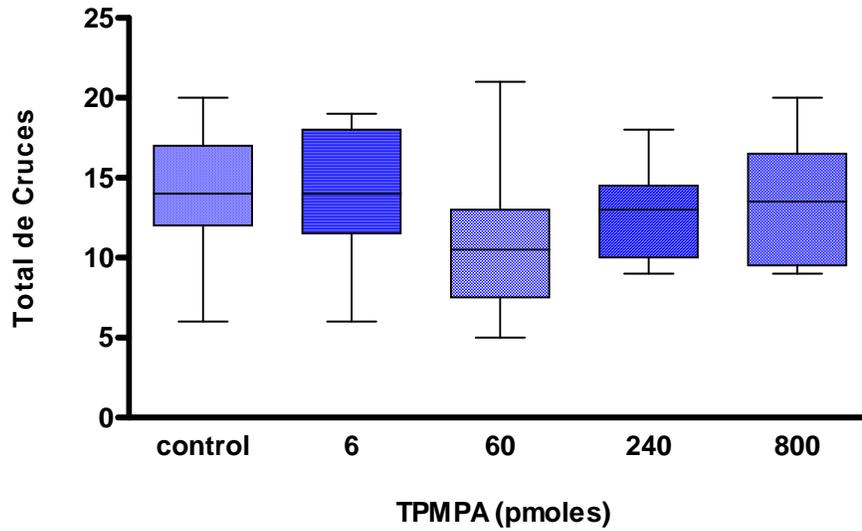
*Gráfica No. 4.* Efectos de la inyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA sobre el número de visitas a los brazos cerrados del laberinto. Ninguna de las dosis probadas provocó cambios significativos (visitas a brazos abiertos + cerrados = 100 %). Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.

## **Visitas a los brazos abiertos más los cerrados**

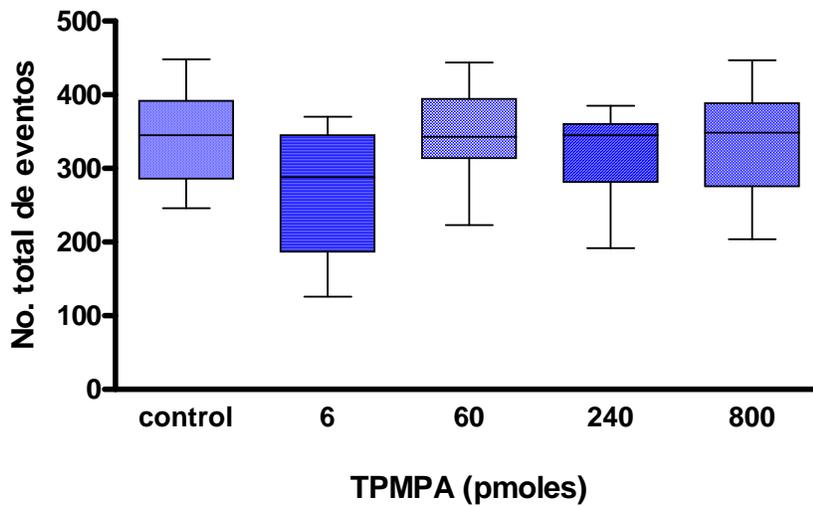
En congruencia con los resultados anteriores el número total de cruces de los sujetos a los brazos abiertos más los cerrados del laberinto, que se toma como la medida de actividad locomotriz dentro de esta tarea, no presentó cambios significativos en ninguna de las dosis de TPMPA comparados contra el control ( $F_{(4, 47)} 1.194, P>0.05$ , *Gráfica No. 5*).

## **Actividad locomotriz en “campo abierto”**

La intención de someter a los animales a esta prueba y medir su actividad locomotriz fuera del laberinto elevado en forma de “+”, fue poder separarla de la actividad exploratoria directa a los brazos del laberinto y con ello descartar la posibilidad de que los cambios observados tanto en el tiempo como que los animales pasan en los brazos del laberinto como en el número de cruces, se deba a que las dosis administradas pudieran estar contaminados por modificaciones en el estado locomotor de los animales. Como puede observarse en la *Gráfica No.6*, ninguna de las dosis de TPMPA inyectada afectó significativamente la locomoción de los animales en la prueba de “campo abierto” con respecto al control ( $F_{(4, 47)} =1.761, P>0.05$ ).



*Gráfica No. 5* Efectos de la inyección bilateral intra-amigdalina de TPMPA sobre las visitas a los brazos abiertos más los cerrados del laberinto. Ninguna de las dosis probadas provocó cambios significativos en el porcentaje de visitas a los brazos abiertos del laberinto (vistas a brazos abiertos + cerrados = 100 %). Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.



*Gráfica No. 6.* Efecto de la administración de TPMPA sobre la locomoción de los animales en la prueba del “campo abierto” Ninguna de las dosis de TPMPA inyectadas bilateralmente a la amígdala provocó cambios significativos en la

**locomoción.** Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.

#### **4.4 Efecto de la microinyección bilateral intra-amigdalina de bicuculina**

**sobre la conducta de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+”.**

##### **Tiempo transcurrido en los brazos abiertos del laberinto**

La *Gráfica No.7*, indica que la inyección bilateral intraamigdalina de bicuculina a distintas dosis (1.8, 6, 16 y 60pmoles), justo antes de someter a los sujetos a la prueba del laberinto, no fue capaz de modificar el tiempo utilizado por los sujetos para la exploración de los brazos abiertos del laberinto en comparación con los animales control ( $F_{(4,62)} = 1.385, P > 0.05$ ).

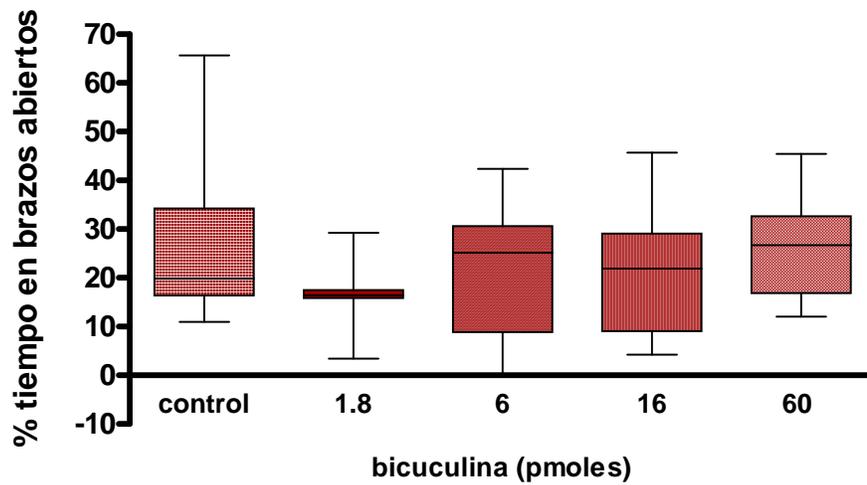
##### **Tiempo transcurrido en los brazos cerrados del laberinto**

Al tomar en cuenta los resultados del tiempo que los animales pasan en los **brazos cerrados del laberinto**, se observa que el análisis de varianza no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $F_{(4,62)} = 1.178, P > 0.05$ , *Gráfica No. 8*) indicando la falta de efectos de la bicuculina sobre este parámetro.

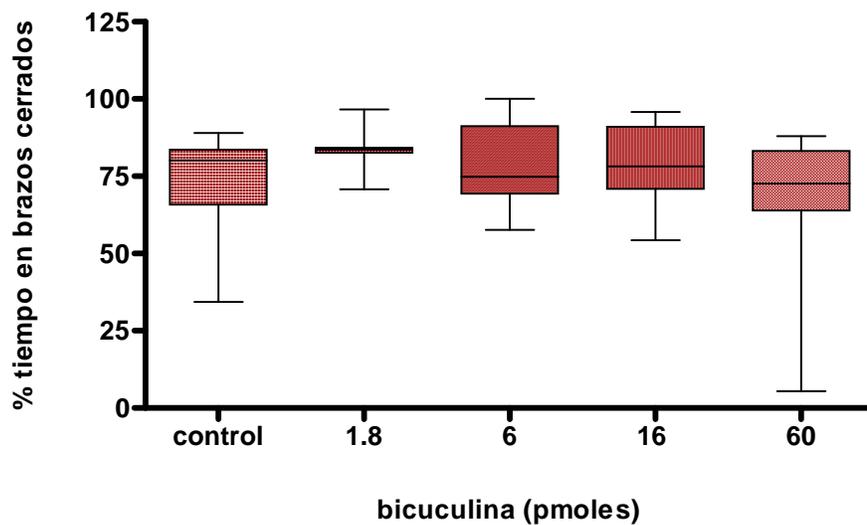
##### **Porcentaje de cruces a los brazos abiertos del laberinto**

Aunque la prueba de ANOVA de una vía indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $F_{(4,62)} = 2.625, P < 0.05$ , *Gráfica No. 9*) entre los animales tratados bilateralmente con distintas dosis de bicuculina sobre el porcentaje de entradas a

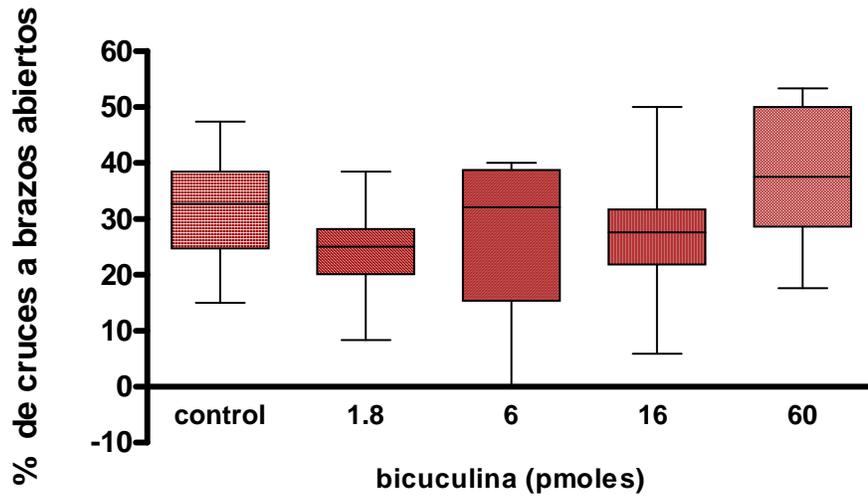
los brazos abiertos del laberinto, el análisis post-hoc de los resultados (pueba de Dunnet) indicó que estos cambios no eran atribuibles a diferencias entre los grupos de animales tratados y el grupo control.



*Gráfica No. 7* Efectos de la inyección bilateral intramigdalina de bicuculina, sobre el tiempo que los sujetos permanecen en los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de “+”. Obsérvese que la administración bilateral de bicuculina no modificó el tiempo que los animales tratados permanecieron en los brazos abiertos del laberinto en comparación con sus controles. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.



**Gráfica No 8.** Efectos de la inyección bilateral intramigdalina de bicuculina, sobre el tiempo que los sujetos permanecen en los brazos cerrados del laberinto elevado en forma de “+”. Obsérvese que la administración bilateral de bicuculina no modificó el tiempo que los animales tratados permanecieron en los brazos cerrados del laberinto en comparación con sus controles. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.



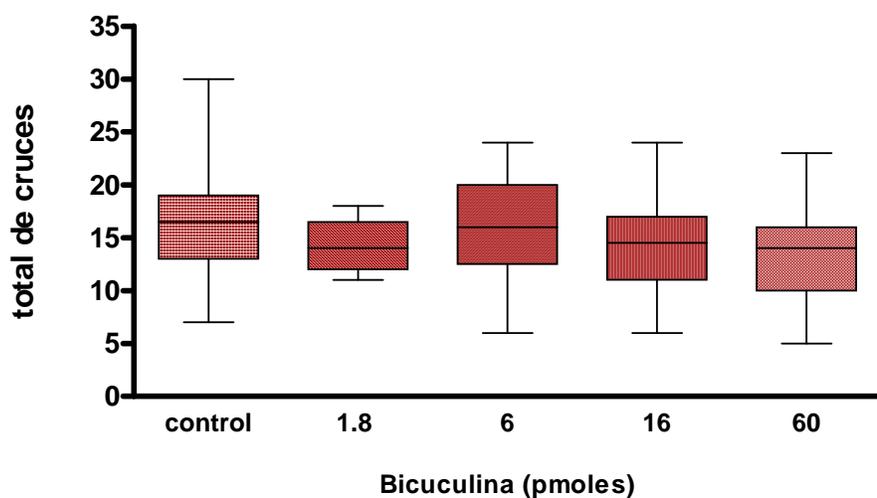
**Gráfica No. 9.** Efectos de la inyección bilateral intramigdalina de bicuculina, sobre el porcentaje del número de veces que los sujetos cruzan hacia los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de “+”. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra. Observe que la administración de bicuculina no modificó el número de visitas de los animales a los brazos abiertos del laberinto en comparación con el grupo control.

## Visitas a los brazos abiertos más los cerrados

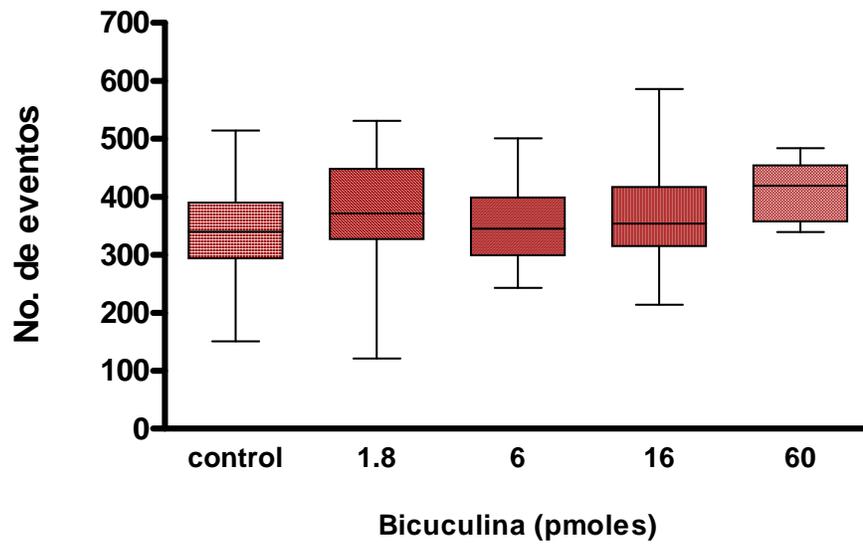
El número total de cruces a los brazos abiertos más los cerrados del laberinto a cualquier brazo no presentó cambios significativos con ninguna de las dosis microinyectadas de bicuculina ( $F_{(4,62)} = 0.9509$ ,  $P > 0.05$ , Gráfica No. 10).

## Actividad Locomotriz en campo abierto

Los resultados obtenidos indican que la locomoción de los animales en la prueba de “campo abierto” no se modificó, con respecto al grupo control, con ninguna de las dosis microinyectadas de bicuculina. ( $F_{(4,62)} = 1.389$ ,  $P > 0.05$ , *Gráfica No. 11*).



*Gráfica 10.* Efectos de la inyección bilateral intramigdalina de bicuculina sobre el número de visitas a los brazos abiertos + los brazos cerrados del laberinto elevado en forma de “+”. Ninguna de las dosis usadas provocó cambios significativos en este parámetro. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.



*Gráfica No. 11.* Efecto de la administración de bicuculina sobre la locomoción de los animales en la prueba del “campo abierto” Ninguna de las dosis de bicuculina inyectadas bilateralmente a la amígdala provocó cambios significativos en la locomoción en el “campo abierto”. Los resultados son expresados como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (barras). Las líneas muestran los valores más altos y más bajos dentro de la muestra.

## **5. DISCUSIÓN**

En este trabajo de tesis, se proporciona, por primera vez, evidencia experimental que sugiere la existencia de receptores GABA<sub>C</sub> en la amígdala de la rata. Más aún, nuestros resultados indican que dichos receptores pudieran estar involucrados en la modulación de la ansiedad. Así como en otros estudios la administración bilateral intra-amigdalina de TPMPA, un antagonista específico para los receptores GABA<sub>C</sub> (Ragozzino et al., 1996) dentro del rango de dosis (1 –1000 pmoles por hemisferio) fue capaz de modificar la formación de la memoria a corto plazo en el pollo (Gibbs y Johnston, 2005), en nuestros experimentos, el TPMPA, en un rango de 60 a 240 pmoles por hemisferio, logró modificar la conducta exploratoria de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+”, en comparación con los animales control inyectados con solución salina, sugiriendo la existencia de receptores GABA<sub>C</sub> en la amígdala. Dado que el laberinto elevado en forma de “+” ha sido ampliamente validado como un paradigma de ansiedad que explota la aversión natural de los roedores por los espacios abiertos, representados en este laberinto por sus brazos abiertos (Pellow et al., 1985), es posible que los receptores GABA<sub>C</sub> amigdalinos participen en la modulación de la ansiedad.

De acuerdo con lo anterior, la administración bilateral intramigdalina de TPMPA (60 pmoles por lado) disminuyó significativamente el tiempo que las ratas pasan en los brazos abiertos del laberinto. Dicho efecto no se observó con dosis bajas de TPMPA (6 pmoles por lado) y tendió a disminuir al incrementarse la dosis de este compuesto (240 pmoles por lado) hasta dejar de ser estadísticamente significativo a dosis de 800 pmoles por lado. En congruencia con estos resultados, el tiempo de permanencia de las ratas aumentó significativamente en los brazos cerrados del laberinto a dosis de 60 y 240 pmoles por lado

y no se modificó con dosis más altas o más bajas del antagonista. En forma análoga el TPMPA logró, a las dosis que afectaron el tiempo de permanencia de las ratas en los brazos abiertos del laberinto (60 y 240 pmoles por lado), disminuir el número de visitas a dichos brazos enfatizando de esta manera la aversión de los animales por los espacios abiertos del laberinto. Desafortunadamente, aunque la disminución de las visitas a los brazos abiertos con dosis de 60 y 240 pmoles de TPMPA es clara, debido muy probablemente a la variabilidad experimental observada no se alcanzaron significancias estadísticas. En contraste con los resultados anteriores, la administración bilateral intra-amigdalina de bicuculina, un antagonista específico para los receptores GABA<sub>A</sub> a las dosis (60 pmoles por lado) en las que el TPMPA muestra su mayor efecto conductual en el laberinto elevado en forma de “+” no tuvo efectos sobre los parámetros estudiados en este paradigma. Debido a la aparición eventual de convulsiones (ver sección 4.2) no se probaron dosis más altas de este compuesto.

Los efectos del TPMPA observados en el laberinto elevado en forma de “+” y la falta de efectos de la bicuculina en este paradigma no parecen depender de cambios inducidos por estos compuestos sobre el nivel de la actividad motriz de los animales ya que en el número de visitas a los brazos abiertos más los cerrados del laberinto, que es una medida de la locomoción de los animales en esta prueba (Pellow et al., 1985; Dawson et al., 1995), no se modificó por ninguno de estos compuestos. En apoyo de lo anterior, ni el TPMPA ni la bicuculina modificaron la locomoción de las ratas en la prueba de “campo abierto” cuando fueron administrados en la amígdala bajo las mismas condiciones que en los experimentos en el laberinto elevado en forma de “+”.

Dado que en ratas que han sido cruzadas para generar un fenotipo de alta ansiedad existe una tendencia a evitar y permanecer en los brazos abiertos del laberinto elevado en

forma de “+” (Henniger et al., 2000) y la administración de compuestos ansiogénicos produce una conducta similar (Pellow et al, 1985; Pérez de la Mora et al., 2007), los resultados obtenidos en este trabajo indican que la administración bilateral intra-amigdalina de TPMPA tuvo efectos ansiogénicos, pues tras el tratamiento con este compuesto se observó un incremento en la aversión de las ratas por los brazos abiertos del laberinto y un aumento consecutivo en el tiempo que estuvieron en sus brazos cerrados.

Es interesante el hallazgo de que una vez alcanzados los efectos ansiogénicos del TPMPA con 60 pmoles por lado, estos disminuyen conforme se incrementa la dosis, permaneciendo estacionarios en la cercanía del rango nanomolar. La razón de esto se desconoce, pero una posibilidad es que el fármaco pudiera perder especificidad por el receptor y actuar en otros sistemas de neurotransmisión cercanos; aunque de la misma forma podemos hipotetizar que el TPMPA microinyectado en nuestros experimentos probablemente este presentando un efecto de saturación sobre los receptores GABA<sub>C</sub> a los que antagoniza. Es ilustrativo a este respecto, que como en nuestro caso, los efectos del TPMPA sobre la formación de la memoria a corto plazo en el pollo son máximos con una dosis de 300 pmoles por hemisferio y después desaparecen (Gibbs y Johnston, 2005).

Dado que los receptores GABA<sub>A</sub> juegan un papel central en la modulación de la ansiedad (Flores Gracia, 2005) y de que existe una gran densidad de ellos en la amígdala (Swanson y Petrovich, 1998); se compararon , bajo condiciones experimentales idénticas los efectos del TPMPA con los de la bicuculina que selectivamente bloquea a los receptores GABA<sub>A</sub>. Nuestros resultados mostraron, como se señaló antes, que a diferencia del TPMPA, la bicuculina, dentro del rango de dosis de 1.8-60 pmoles por lado, no modificó la conducta exploratoria de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+”. Nuestros resultados, coinciden con los de Rezayat et al, (2005) quienes tras la inyección de dosis

mucho más altas de bicuculina (2-8 nanomoles por lado) en la región CA1 del hipocampo dorsal no encontraron efectos de este antagonista sobre la conducta de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+”; al igual que con los de Zarrindast et. al. (2001), quienes obtuvieron resultados idénticos en el mismo paradigma tras la inyección intra-cerebro-ventricular de bicuculina. Sin embargo, Cabe mencionar que la administración de 20 pmoles por lado de este compuesto produjo un aumento en la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, así como efectos ansiogénicos en la prueba de “interacción social” cuando fue microinyectada dentro del núcleo basolateral (BLA), pero no produjo ningún efecto cuando fue microinyectada dentro del núcleo central (CeA) de la amígdala (Shekhar, 1997). Dado que al parecer, los efectos del TPMPA y la bicuculina sobre la ansiedad se hacen aparentes con distintos modelos de ansiedad y de que cada paradigma modela distintos aspectos de esta respuesta (Broekkamp, 1997; Killcross et al., 1997), es posible que los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> amigdalinos modulen distintos aspectos de la ansiedad y de que los efectos de la bicuculina en la prueba de interacción social dependan del sitio de microinyección.

Dado que los efectos de la bicuculina y del TPMPA microinyectados en ésta región son cualitativamente distintos, es poco probable que los efectos del TPMPA sobre la ansiedad, observados en este trabajo, pudieran deberse a efectos inespecíficos ejercidos sobre receptores GABA<sub>A</sub> (Ragozzino et al., 1996), lo cual nos permite inferir que nuestros resultados apoyan la existencia de receptores GABA<sub>C</sub> en la amígdala de la rata.

Por otro lado, La aparición de convulsiones “clínicas” con dosis de bicuculina de 60 pmoles por lado y la ausencia de éstas hasta con dosis más de 10 veces mayores de TPMPA apoya la conclusión anterior y sugiere que ambos tipos de receptores GABAérgicos poseen distintos papeles en el funcionamiento de la amígdala.

### **Sitio de acción del TPMPA en la amígdala.**

El sitio de acción del TPMPA microinyectado dentro de la amígdala es incierto, pero bajo las condiciones de microinyección utilizadas en este trabajo se ha demostrado que el 2-metil-6(feniletetil) piridina (MPEP), de dimensiones similares a las del TPMPA y la bicuculina, no difunde más allá de 1 mm<sup>3</sup> de su sitio de inyección (Pérez de la Mora et al., 2006), es por esto, que se puede asumir que dicho sitio de acción se encuentra dentro de la amígdala; la forma mediante la cual podemos comprobar el volumen de difusión es mediante los registros histológicos donde se observa un volumen de difusión bien delimitado por el azul de pontamina, microinyectado bajo las mismas condiciones. Mas aún, la posibilidad de que los compuestos inyectados hayan alcanzado sitios distantes a la amígdala, vía su ingreso al sistema ventricular, es poco probable, ya que las puntas de las cánulas de ninguno de los animales utilizados en el análisis de los resultados estuvieron cerca de los ventrículos laterales.

La distribución anatómica de los receptores GABA<sub>C</sub> en el cerebro de los mamíferos no ha sido estudiada con suficiente detalle y por consiguiente no existe evidencia convincente de la presencia o ausencia de estos receptores en la amígdala. Sin embargo, dada la elevada especificidad del TPMPA por los receptores GABA<sub>C</sub> (Ragozzino et al., 1996; Johnston et al., 2003), la posición de las cánulas y el grado de difusión señalado, es probable que este antagonista, en nuestros experimentos, haya ejercido sus efectos bloqueando receptores GABA<sub>C</sub> localizados en interneuronas (Schlicker et al., 2004)

situadas dentro de los núcleos BLA o CeA, o ubicadas en el interior de las islas intercaladas (ITC) paracapsulares laterales o mediales, incluyendo a la isla intercalada principal.

Los experimentos de fijación de voltaje (“patch clamp”) de una sola célula realizados por Delaney y Sah (2001), en los que demostraron la presencia de minicorrientes inhibitorias en la porcion lateral del núcleo central de la amígdala (CeL) que se inhiben parcialmente por la aplicación focal tanto de TPMPA como de bicuculina, sugiriendo la existencia de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> en esta porción de la amígdala, apoyan nuestra sugerencia anterior y sugieren que los efectos del TPMPA sobre la conducta observados en este trabajo podrían involucrar, la activación de receptores GABA<sub>C</sub>, al menos, en la porción lateral del núcleo central de la amígdala del lóbulo temporal (CeL).

El mecanismo mediante el cual el TPMPA ejerció sus efectos ansiogénicos y por tanto el papel que los receptores GABA<sub>C</sub> juegan en la modulación de la ansiedad por parte de la amígdala se desconoce. Sin embargo, cabe recordar que el tiempo de apertura promedio para los canales en los receptores GABA<sub>C</sub> es mayor que para los receptores GABA<sub>A</sub>, que los primeros se desensibilizan mas lentamente que los segundos y que los canales asociados a los receptores GABA<sub>C</sub> son activados y cerrados mas lentamente que en el caso de los canales asociados a los receptores GABA<sub>A</sub> (Feigenspan y Bormann, 1994a; Feigenspan y Bormann, 1994b; Feigenspan et al., 1993), todo esto permite sugerir que aunque ambos receptores son activados por el mismo neurotransmisor, tienen un papel diferente en la modulación de la ansiedad por parte de la amígdala. Las diferencias en la conducta de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+” encontradas entre TPMPA (efectos ansiogénicos) y bicuculina (carencia de efectos) en este trabajo estan de acuerdo con esta realidad funcional.

Como se mencionó antes (ver sección 2.2.3), la información sensorial relevante que proviene del entorno del sujeto alcanza, vía el talamo, el núcleo basolateral de la amígdala (BLA), en donde tras un intercambio de información con la corteza prefrontal, se decide la pertinencia e intensidad de una respuesta ansiosa, enviando información al núcleo central, que a su vez, es el encargado de implementar dicha respuesta. En este intercambio de información entre los núcleos basolateral y central, las islas intercaladas paracapsulares (Pare et al., 2004; Marowsky et al., 2005) y posiblemente otros grupos neuronales GABAérgicos, como los localizados en la porción lateral del núcleo central (Sun et al., 1994) juegan un papel fundamental al funcionar como interfases inhibitorias que modulan el flujo de impulsos entre el núcleo basolateral (BLA) y el central de la amígdala (CeA) (Pérez de la Mora, 2008).

Dado que existe evidencia neurofisiológica de la existencia de receptores GABA<sub>C</sub> en la porción lateral del núcleo central de la amígdala que son activados por fibras provenientes de las islas intercaladas paracapsulares (Delaney y Sah, 2001) es posible que el TPMPA haya producido sus efectos sobre la ansiedad alterando en una forma compleja el equilibrio entre la transmisión GABAérgica mediada por receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub> a nivel de las neuronas GABAérgicas de la porción lateral del núcleo central, que mantienen una inhibición tónica sobre neuronas de la porción medial del núcleo central responsables de la inervación de los principales núcleos autonómicos que modulan la respuesta ansiosa (Nose et al., 1991). Alternativamente, el TPMPA podría haber ejercido sus efectos ansiogénicos bloqueando receptores GABA<sub>C</sub> hipotéticos localizados en las mismas o diferentes islas paracapsulares, alterando así la expresión ansiogénica del núcleo central y provocando la conducta ansiosa de las ratas observada en el laberinto elevado en forma de

“+”. Es claro, que aún se requiere de más información para distinguir entre estas alternativas o decidirse por nuevas explicaciones.

## **6. CONCLUSIONES**

Los resultados de este trabajo de tesis muestran que el TPMPA, al ser microinyectado en la amígdala, logra reducir de forma estadísticamente significativa el tiempo que los animales permanecen en los brazos abiertos del laberinto; lo que sugiere la existencia de receptores GABA<sub>C</sub> en la amígdala de la rata e indican que pudieran estar involucrados en la modulación de la ansiedad por parte de la amígdala.

Nuestros hallazgos, también sugieren que los receptores GABA<sub>C</sub> bloqueados por el TPMPA pudieran estar presentes en sitios anatómicos diferentes a los que poseen los receptores GABA<sub>A</sub>, o que dadas sus diferencias funcionales con estos últimos receptores el TPMPA podría haber aumentado el nivel de ansiedad modificando la dinámica inhibitoria mediada por el GABA. Se sugiere que el TPMPA ejerce sus efectos modulatorios sobre la ansiedad alterando el flujo de impulsos nerviosos entre el núcleo basolateral (BLA), la principal estación de entrada de la amígdala, y el núcleo central (CeA), su principal estación de salida, y por consiguiente la responsable de la expresión de su potencial ansiogénico.

Finalmente nuestros resultados muestran posibles diferencias de orden cualitativo entre la ansiedad mostrada por los animales ante el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>C</sub>, lo que sugiere que cada uno podría estar involucrado en distintas funciones dentro de la amígdala y los sistemas de modulación y expresión de la ansiedad, y nos habla de sistemas psicofisiológicos mucho más complejos y selectivos.

## 7. REFERENCIAS.

- Adolphs, R., Gosselin, F., Buchanan, T. W., Tranel, D., Schyns, P., & Damasio, A. R. (2005). A mechanism for impaired fear recognition after amygdala damage. *Nature*, 433(7021), 68-72.
- Adolphs, R., Tranel, D., & Damasio, A. R. (1998). The human amygdala in social judgment. *Nature*, 393(6684), 470-474.
- Adolphs, R. D., H.Tranel, D.Cooper, G.Damasio, A. R. (2000). A role for somatosensory cortices in the visual recognition of emotion as revealed by three-dimensional lesion mapping. *J Neurosci*, 20(7), 2683-2690.
- Adolphs, R. T., D.Damasio, H. (2001). Emotion recognition from faces and prosody following temporal lobectomy. *Neuropsychology*, 15(3), 396-404.
- Adolphs, R. T., D.Damasio, H.Damasio, A. (1994). Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature*, 372(6507), 669-672.
- Adolphs, R. T., D.Damasio, H.Damasio, A. R. (1995). Fear and the human amygdala. *J Neurosci*, 15(9), 5879-5891.
- Adolphs, R. T., D.Hamann, S.Young, A. W.Calder, A. J.Phelps, E. A.Anderson, A.Lee, G. P.Damasio, A. R. (1999). Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage. *Neuropsychologia*, 37(10), 1111-1117.
- Alakuijala, A. A., J.Pasternack, M. (2006). Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci*, 23(2), 514-520.
- Alakuijala, A. P., M.Wegelius, K.Schmidt, M.Enz, R.Paulin, L.Saarma, M.Pasternack, M. (2005). GABA receptor rho subunit expression in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 154(1), 15-23.
- Albrechet-Souza, B., Brandao. (2008). Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *J. Neurosci Methods* doi:10.1016/j.jneumeth.2007.11.025.
- Battaglia, M. B., S.Ogliari, A. ellodi, L.Smeraldi, E. (2001). Modulation by muscarinic antagonists of the response to carbon dioxide challenge in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 58(2), 114-119.
- Bechara, A. D., H.Damasio, A. R. (2003). Role of the amygdala in decision-making. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 356-369.

- Boue-Grabot, E. T., A. Tramu, G. Garret, M. (2000). Molecular and electrophysiological evidence for a GABA<sub>A</sub> receptor in thyrotropin-secreting cells. *Endocrinology*, *141*(5), 1627-1632.
- Bremner, J. D. (1999). Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. *Semin Clin Neuropsychiatry*, *4*(4), 249-255.
- Bremner, J. D. S., L. H. Kaloupek, D. Southwick, S. M. Soufer, R. Charney, D. S. (1999). Neural correlates of exposure to traumatic pictures and sound in Vietnam combat veterans with and without posttraumatic stress disorder: a positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*, *45*(7), 806-816.
- Broekkamp, C. (1997). Predictive validity and the robustness criterion for animal models. *Psychopharmacology (Berl)*, *134*(4), 341-343; discussion 371-347.
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*, *21*(7), 294-299.
- Cahill, L. B., R. Markowitsch, H. J. McGaugh, J. L. (1995). The amygdala and emotional memory. *Nature*, *377*(6547), 295-296.
- Cahill, L. W., N. M. Roozendaal, B. McGaugh, J. L. (1999). Is the amygdala a locus of "conditioned fear"? Some questions and caveats. *Neuron*, *23*(2), 227-228.
- Cameron, O. G. A., J. L. Young, E. A. (2004). Anxious and depressive disorders and their comorbidity: effect on central nervous system noradrenergic function. *Biol Psychiatry*, *56*(11), 875-883.
- Carland, J. E. M., A. M. Hanrahan, J. R. Mewett, K. N. Duke, R. K. Johnston, G. A. Chebib, M. (2004). Mutations of the 2' proline in the M2 domain of the human GABA<sub>A</sub> rho1 subunit alter agonist responses. *Neuropharmacology*, *46*(6), 770-781.
- Costa, E. G., A. Mao, C. C. (1975). Evidence for involvement of GABA in the action of benzodiazepines: studies on rat cerebellum. *Adv Biochem Psychopharmacol*(14), 113-130.
- Cutting, G. R. L., L. O'Hara, B. F. Kasch, L. M. Montrose-Rafizadeh, C. Donovan, D. M. Shimada, S. Antonarakis, S. E. Guggino, W. B. Uhl, G. R. et al., (1991). Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(7), 2673-2677.
- Chavas, J., & Marty, A. (2003). Coexistence of excitatory and inhibitory GABA synapses in the cerebellar interneuron network. *J Neurosci*, *23*(6), 2019-2031.
- Chebib, M. (2004). GABA<sub>A</sub> receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *31*(11), 800-804.

- Chebib, M., & Johnston, G. A. (1999). The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26(11), 937-940.
- Chen, Y. Z., D.Zhou, K.Ren, Y.Dai, W.Xu, M.Lu, L.Lu, Z. (2007). Study on olfactory function in GABA(C) receptor/channel rho(1) subunit knockout mice. *Neurosci Lett*, 427(1), 10-15.
- Cherubini, E., & Conti, F. (2001). Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci*, 24(3), 155-162.
- Dawson, G. R., & Tricklebank, M. D. (1995). Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci*, 16(2), 33-36.
- Dawson, G. R. C., S. P.Collinson, N.Iversen, S. D.Tricklebank, M. D. (1995). Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 118(3), 316-323.
- de la Mora, M. P. C.-C., L.Vazquez-Garcia, M.Crespo-Ramirez, M.Jacobsen, K.Hoistad, M.Agnati, L.Fuxe, K. (2005). Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. *Neurosci Lett*, 377(2), 101-105.
- de Olmos, J. S., & Heimer, L. (1999). The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 1-32.
- Delaney, A. J., & Sah, P. (1999). GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. *J Neurosci*, 19(22), 9698-9704.
- Delaney, A. J., & Sah, P. (2001). Pathway-specific targeting of GABA(A) receptor subtypes to somatic and dendritic synapses in the central amygdala. *J Neurophysiol*, 86(2), 717-723.
- Deschaux, O. F., W.Gottesmann, C. (2006). Influence of a GABA(B) and GABA(C) receptor antagonist on sleep-waking cycle in the rat. *Eur J Pharmacol*, 535(1-3), 177-181.
- Di Cara, S. D., Salin P, Kerkerian-Le, Goff L, Daszuta A. (2003). Serotonergic regulation of the GABAergic transmission in the rat basal ganglia. *Sinapse*, 50(2), 144-150.
- Dolan, R. J., & Vuilleumier, P. (2003). Amygdala automaticity in emotional processing. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 348-355.
- Enz, R. R., B. J.Cutting, G. R. (1999). Expression of the voltage-gated chloride channel ClC-2 in rod bipolar cells of the rat retina. *J Neurosci*, 19(22), 9841-9847.

- Feigenspan, A., & Bormann, J. (1994a). Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol*, 288(1), 97-104.
- Feigenspan, A., & Bormann, J. (1994b). Modulation of GABAC receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J Physiol*, 481 ( Pt 2), 325-330.
- Feigenspan, A. W., H.Bormann, J. (1993). Pharmacology of GABA receptor Cl- channels in rat retinal bipolar cells. *Nature*, 361(6408), 159-162.
- File, S. E. Z., H., Jr. (1993). "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state? *Psychopharmacology (Berl)*, 110(1-2), 240-244.
- File, S. E. Z., H., Jr.Sanders, F. L.Mabbutt, P. S. (1994). Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*, 113(3-4), 543-546.
- Filippova, N. S., A.Tyler, W. J.Whitworth, T. L.Fortinberry, H.Weiss, D. S. (2001). Recombinant GABA(C) receptors expressed in rat hippocampal neurons after infection with an adenovirus containing the human rho1 subunit. *J Physiol*, 535(Pt 1), 145-153.
- Flores Gracia, C. P. (2005). *Receptores GABAa de la amígdala de mamíferos: su función en la modulación de la ansiedad*. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.
- Fuxe, K. A., L.Bolme, P. (1975). The possible involvement of GABA mechanisms in the action of benzodiazepines on central catecholamine neurons. *Psychopharmacol Bull*, 11(4), 55-56.
- Fuxe, K. J., K. X.Hoistad, M.Tinner, B.Jansson, A.Staines, W. A.Agnati, L. F. (2003). The dopamine D1 receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: relationship to the dopamine innervation. *Neuroscience*, 119(3), 733-746.
- Galarreta, M., & Hestrin, S. (2002). Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12438-12443.
- Gibbs, M. E., & Johnston, G. A. (2005). Opposing roles for GABAA and GABAC receptors in short-term memory formation in young chicks. *Neuroscience*, 131(3), 567-576.
- Haefely, W. F., M.Schoch, P.Martin, J. R.Bonetti, E. P.Moreau, J. L.Jenck, F.Richards, J. G. (1992). Partial agonists of benzodiazepine receptors for the treatment of epilepsy, sleep, and anxiety disorders. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 47, 379-394.

- Haefly, K., Möhler H, Pieri L, Pole P, Schaffener R. (1975). Possible involvement of the GABA in central action of benzodiazepines. *Raven Press, New York*, 131-142.
- Hamann, S. B. S., L.Squire, L. R.Adolphs, R.Tranel, D.Damasio, H.Damasio, A. (1996). Recognizing facial emotion. *Nature*, 379(6565), 497.
- Hartmann, K. S., F.Draguhn, A.Frahm, C. (2004). Iontropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. *Eur J Pharmacol*, 497(2), 139-146.
- Henniger, M. S. O., F.Holter, S. M.Weissenbacher, P.Toschi, N.Lorscher, P.Wigger, A.Spanagel, R.Landgraf, R. (2000). Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res*, 111(1-2), 153-163.
- Herman, J. P. M., N. K.Figueiredo, H. (2004). Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann N Y Acad Sci*, 1018, 35-45.
- Hernández-Gómez, A.-R., Pérez de la Mora M. (2002). Role of Cholecystokinin-A and Cholecystokinin-B receptor in anxiety. *Amino acids*, 23, 283-290.
- imagescope.org. (2006). Amygdala. Retrieved 24/06/2007, <http://www.astralvoyage.com/projection/amygdala.html>
- IQB. (2007). medciclopedia. Retrieved 29/05, 2007 <http://www.iqb.es/diccio/diccio1.htm>
- Irie, T. M., E.Kitagawa, K.Maruyama, Y.Inoue, K.Inagaki, C. (2001). An anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, inhibits ammonia-induced increases in the intracellular Cl(-) of cultured rat hippocampal neurons via GABA(c) receptors. *Neurosci Lett*, 312(2), 121-123.
- Ivanova, S. Y. L., I. V.Pivneva, T. A.Belan, P. V.Storozhuk, M. V.Kostyuk, P. G. (2004). Differential properties of GABAergic synaptic connections in rat hippocampal cell cultures. *Synapse*, 53(2), 122-130.
- Jardim, M. C., & Guimaraes, F. S. (2004). Role of glutamate ionotropic receptors in the dorsomedial hypothalamic nucleus on anxiety and locomotor behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 79(3), 541-546.
- Johnston, G. A. C., D. R.Beart, P. M.Game, C. J.McCulloch, R. M.Twitchin, B. (1975). Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J Neurochem*, 24(1), 157-160.
- Johnston, G. A. C., M.Hanrahan, J. R.Mewett, K. N. (2003). GABA(C) receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2(4), 260-268.

- Kandel ER., S. J., Jessell TM (Ed.). (2001). *Principios de Neurociencia* (Cuarta Edición ed.). Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.
- Killcross, S. R., T. W.Everitt, B. J. (1997). Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature*, 388(6640), 377-380.
- Kirouac, G. J. L., S.Mabrouk, G. (2004). GABAergic projection from the ventral tegmental area and substantia nigra to the periaqueductal gray region and the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, 469(2), 170-184.
- Kluver, H., & Bucy, P. C. (1997). Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. 1939. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 9(4), 606-620.
- Koenigs, M. H., E. D.Raymont, V.Cheon, B.Solomon, J.Wassermann, E. M.Grafman, J. (2007). Focal brain damage protects against post-traumatic stress disorder in combat veterans. *Nat Neurosci*.
- Kumar A, Naidu PS, Seghal N, Padi SS.(2007). Neuroprotective effects of resveratrol against intracerebroventricular colchicine-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Pharmacology*, 79(1):17-26.
- Kuribara, H., Kishi, E., & Maruyama, Y. (2000). Does dihydrohonokiol, a potent anxiolytic compound, result in the development of benzodiazepine-like side effects? *J Pharm Pharmacol*, 52(8), 1017-1022.
- LaBar, K. S. G., J. C.Gore, J. C.LeDoux, J. E.Phelps, E. A. (1998). Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron*, 20(5), 937-945.
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol*, 23(4-5), 727-738.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 23, 155-184.
- LeDoux, J. E. F., C. R.Milner, T. A. (1991). Ultrastructure and synaptic associations of auditory thalamo-amygdala projections in the rat. *Exp Brain Res*, 85(3), 577-586.
- Li, W. C., D. F.Alakoskela, J. M.Kinnunen, P. K.Steinbach, J. H. (2006). Enantiomers of neuroactive steroids support a specific interaction with the GABA-C receptor as the mechanism of steroid action. *Mol Pharmacol*, 69(6), 1779-1782.
- Li, W. J., X.Covey, D. F.Steinbach, J. H. (2007). Neuroactive steroids and human recombinant rho1 GABAC receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 323(1), 236-247.
- Likhtik, E. P., J. G.Paz, R.Pare, D. (2005). Prefrontal control of the amygdala. *J Neurosci*, 25(32), 7429-7437.

- Lopez-Chavez, A. M., R.Martinez-Torres, A. (2005). Cloning and functional expression of the bovine GABA(C) rho2 subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci Res*, 53(4), 421-427.
- López-Ibor Aliño, D. d. l. e. e. (1997). *DSM-IV Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales*. (T. d. F. i. Formenti, Trans. Versión Española de la cuarta edición en lengua inglesa ed. Vol. 1). Barcelona, España: Masson, S.A.
- Luria A.R. (1988). *El cerebro en acción*. (Tr. al español Mercedes Torres) Barcelona, España. Martinez Roca.
- Majak, K., & Pitkanen, A. (2003). Projections from the periamygdaloid cortex to the amygdaloid complex, the hippocampal formation, and the parahippocampal region: a PHA-L study in the rat. *Hippocampus*, 13(8), 922-942.
- Marowsky, A. Y., Y.Obata, K.Vogt, K. E. (2005). A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron*, 48(6), 1025-1037.
- Martinez-Torres, A., & Miledi, R. (2004). A single amino acid change within the ion-channel domain of the gamma-aminobutyric acid rho1 receptor accelerates desensitization and increases taurine agonism. *Arch Med Res*, 35(3), 194-198.
- McDonald, A. J. (2003). Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 1-21.
- McDonald, A. J. M., F.Guo, L. (1996). Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 71(1), 55-75.
- McGaugh, J. L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends Neurosci*, 25(9), 456.
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci*, 27, 1-28.
- Medina-Mora, B. G., Muñoz CL, Benjel C, Blanco J, Bautista CF, Villatoro J, Rojas E, Zambrano J, Casanova L, Aguiar-Gaxiola S. (2003). Prevalencia de Estados Mentales: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, 26 No. 4.
- Milligan, C. J. B., N. J.Garret, M.Deuchars, J.Deuchars, S. A. (2004). Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABAA and GABAC receptor subunits in native central neurons. *J Neurosci*, 24(33), 7241-7250.

- Miranda, M. I. F., G.Ramirez-Lugo, L.Bermudez-Rattoni, F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11417-11422.
- Mody, I. (2001). Distinguishing between GABA(A) receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem Res*, 26(8-9), 907-913.
- Mölher, O. (1977). Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science*, 198, 849-851.
- Montgomery, K. C. (1958). The relation Between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48, 254-260.
- Morris, K. D. M., C. N.Amin, J. (1999). Differential modulation of the gamma-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol*, 56(4), 752-759.
- Nose, I. H., H.Inokuchi, H.Nishi, S. (1991). Synaptic responses of guinea pig and rat central amygdala neurons in vitro. *J Neurophysiol*, 65(5), 1227-1241.
- Pan, Y. K., P.Ripps, H.Qian, H. (2005). Pharmacology of GABAC receptors: responses to agonists and antagonists distinguish A- and B-subtypes of homomeric rho receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett*, 376(1), 60-65.
- Pare, D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog Neurobiol*, 70(5), 409-420.
- Pare, D. Q., G. J.Ledoux, J. E. (2004). New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol*, 92(1), 1-9.
- Pare, D. R., S.Smith, Y.Lang, E. J. (2003). Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 78-91.
- Parent, M. B. W., M.McGaugh, J. L. (1994). Memory of rats with amygdala lesions induced 30 days after footshock-motivated escape training reflects degree of original training. *Behav Neurosci*, 108(6), 1080-1087.
- Pellow, S. C., P.File, S. E.Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3), 149-167.
- Pérez de la Mora, H.-G., Arizmendi-García,Jacobsen,Lara-García,Flores-Gracia,Crespo-Ramírez,Gallegos-Cari,Nuche-Bricaire,Fuxe. (2007). Role of the amygdaloid cholecystokinin (CCK)/gastrin-2receptors and terminal networks in the modulation of anxiety in the rat. Effects of CCK-4 and CCK-8Son anxiety-like behaviour and [3H]GABA release. *European Journal of Neuroscience*, 26, 3614–3630.

- Pérez de la Mora, J. K., Crespo-Ramirez M, Flores-Gracia C, Fuxe K. (2008). Wiring and volume transmission in rat amygdala. Implications for fear and anxiety. *Neurochemical Research, in press*.
- Pérez de la Mora, L.-G., Jacobsen, Vázquez-García, Crespo-Ramírez, Flores-Gracia, Escamilla-Marvan and Fuxe K. (2006). Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. *European Journal of Neuroscience, 23*, 2749–2759.
- Pérez de la mora, M. (2003). Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases bilógicas *Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias, 54*(2), 13.
- Phelps, E. A., & LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron, 48*(2), 175-187.
- Phelps, E. A. D., M. R. Nearing, K. I. LeDoux, J. E. (2004). Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron, 43*(6), 897-905.
- Pitkanen, A. S., M. Nurminen, N. Ylinen, A. (2003). Intrinsic synaptic circuitry of the amygdala. *Ann N Y Acad Sci, 985*, 34-49.
- Polenzani, L. W., R. M. Miledi, R. (1991). Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A, 88*(10), 4318-4322.
- Price, J. L. (2003). Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann N Y Acad Sci, 985*, 50-58.
- Qian, H. (2000). GABA C receptors in the vertebrate retina. Retrieved 09/03/08, from [webvision.med.utah.edu/imageswv/HQFig2.jpg](http://webvision.med.utah.edu/imageswv/HQFig2.jpg)
- Quirk, G. J. L., E. Pelletier, J. G. Pare, D. (2003). Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *J Neurosci, 23*(25), 8800-8807.
- Ragozzino, D. W., R. M. Murata, Y. Eusebi, F. Overman, L. E. Miledi, R. (1996). Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid C receptor antagonist. *Mol Pharmacol, 50*(4), 1024-1030.
- Rainnie, D. G. (2003). Inhibitory and excitatory circuitries in amygdala nuclei: a synopsis of session II. *Ann N Y Acad Sci, 985*, 59-66.
- Rezayat, M. R., A. Zarrindast, M. R. Massoudi, R. Djahanguiri, B. (2005). Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiol Behav, 84*(5), 775-782.

- Riedel, A. H., W.Seeger, G.Gartner, U.Brauer, K.Arendt, T. (2002). Principles of rat subcortical forebrain organization: a study using histological techniques and multiple fluorescence labeling. *J Chem Neuroanat*, 23(2), 75-104.
- Rojas, Enrique (1998). *La ansiedad : como diagnosticar y superar el estres, las fobias y las obsesiones*. Madrid, España: Temas de Hoy, Colección vivir mejor.
- Royer, S. M., M.Pare, D. (1999). An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci*, 19(23), 10575-10583.
- Royer, S. M., M.Pare, D. (2000). Polarized synaptic interactions between intercalated neurons of the amygdala. *J Neurophysiol*, 83(6), 3509-3518.
- Royet, J. P. Z., D.Versace, R.Costes, N.Lavenne, F.Koenig, O.Gervais, R. (2000). Emotional responses to pleasant and unpleasant olfactory, visual, and auditory stimuli: a positron emission tomography study. *J Neurosci*, 20(20), 7752-7759.
- Rozog Z, S. G., Klodzinska A. (2004). Anxiolytic and antidepressant-like effects of 7-OH-DPAT, preferential dopamine D(3) receptor agonist, in rats. *Pol J Pharmacol*, 56(5), 519-526.
- Sander, D. G., D.Pourtois, G.Schwartz, S.Seghier, M. L.Scherer, K. R.Vuilleumier, P. (2005). Emotion and attention interactions in social cognition: brain regions involved in processing anger prosody. *Neuroimage*, 28(4), 848-858.
- Scibilia, R. J. L., J. E.Kilts, C. D. (1992). Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Synapse*, 11(2), 146-154.
- Schlicker, K. B., M.Schmidt, M. (2004). GABAC receptor mediated inhibition in acutely isolated neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res Bull*, 63(2), 91-97.
- Shekhar, S. a. (1997). Excitatory Amino Acid Receptor Antagonist Block the Cardiovascular and anxiety Responses Elicited by Gama-aminobutyric Acid A Receptor Blockade in the Basolateral Amygdala of Rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283 (2), 969-977.
- Shimada, S. C., G.Uhl, G. R. (1992). gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol*, 41(4), 683-687.
- Siebert, M. M., H. J.Bartel, P. (2003). Amygdala, affect and cognition: evidence from 10 patients with Urbach-Wiethe disease. *Brain*, 126(Pt 12), 2627-2637.

- Squires, R. F., & Brastrup, C. (1977). Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, 266(5604), 732-734.
- Stein D. J., Hollander E.(2006). *Tratado de los trastornos de ansiedad, Fasciculo I*. Barcelona, España: Psiquiatria Editores S.L.
- Sun, N. Y., H.Cassell, M. D. (1994). Evidence for a GABAergic interface between cortical afferents and brainstem projection neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol*, 340(1), 43-64.
- Swanson, L. W. (2003). The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 174-184.
- Swanson, L. W., & Petrovich, G. D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci*, 21(8), 323-331.
- Torras, M. P., I.Morgado, I. (2001). [The amigdaloid body: functional implications]. *Rev Neurol*, 33(5), 471-476.
- Ulfig, N. S., M.Bohl, J. (2003). Ontogeny of the human amygdala. *Ann N Y Acad Sci*, 985, 22-33.
- Vallejo R. J., Gastó F. C.(2000). *Trastornos afectivos: ansiedad y depresión*. España: Masson: España.
- Vazdarjanova, A., & McGaugh, J. L. (1998). Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25), 15003-15007.
- Vazdarjanova, A., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala is involved in modulating consolidation of memory for classical fear conditioning. *J Neurosci*, 19(15), 6615-6622.
- Vuilleumier, P. (2005). How brains beware: neural mechanisms of emotional attention. *Trends Cogn Sci*, 9(12), 585-594.
- Vuilleumier, P., & Pourtois, G. (2007). Distributed and interactive brain mechanisms during emotion face perception: evidence from functional neuroimaging. *Neuropsychologia*, 45(1), 174-194.
- Vuilleumier, P. R., M. P.Armony, J. L.Driver, J.Dolan, R. J. (2004). Distant influences of amygdala lesion on visual cortical activation during emotional face processing. *Nat Neurosci*, 7(11), 1271-1278.
- Wilensky, A. E. S., G. E.Kristensen, M. P.LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *J Neurosci*, 26(48), 12387-12396.

- Wilensky, A. E. S., G. E. LeDoux, J. E. (2000). The amygdala modulates memory consolidation of fear-motivated inhibitory avoidance learning but not classical fear conditioning. *J Neurosci*, 20(18), 7059-7066.
- Yang, L. O., K. Omori, K. Otani, H. Suzukawa, J. Inagaki, C. (2003). GABAC receptor agonist suppressed ammonia-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons by restoring phosphorylated BAD level. *J Neurochem*, 87(3), 791-800.
- Zald, D. H. (2003). The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res Brain Res Rev*, 41(1), 88-123.
- Zald, D. H., & Pardo, J. V. (1997). Emotion, olfaction, and the human amygdala: amygdala activation during aversive olfactory stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8), 4119-4124.
- Zarrindast, M. R., P. Sadeghi-Hariri, M. (2001). GABA(A) but not GABA(B) receptor stimulation induces antianxiety profile in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 69(1-2), 9-15.

## **8.-INDICE DE ABREVIATURAS**

AA – Núcleo Anterior de la Amígdala

BA – Núcleo Basal de la Amígdala

BM – Núcleo basomedial de la Amígdala

BLA – Complejo Basolateral de la Amígdala

CeA – Núcleo Central de la Amígdala

CoA – Núcleo Cortical de la Amígdala

COAm – Núcleo Corticomedia de la amígdala

EA – Amígdala Extendida

GABA – Ácido gama-aminobutírico

ITC – Islas Intercaladas de la Amígdala

Im – Isla intercalada Principal

Ip- Islas Paracapsulares

LA – Núcleo Lateral de la Amígdala

MAO- Mono amino oxidasa

MD – Núcleo medio dorsal del Tálamo

MeA – Núcleo Medial de la Amígdala

MOR – Movimientos Oculares Rápidos

mPFC – Corteza medial prefrontal

N Acc – Núcleo Accumbens

PTSD – Síndrome de estrés postraumático

RNAm- Ácido ribonucleico mensajero

SI - Sustancia Inominata

SGP – Sustancia gris periacueductal

SNC – Sistema nervioso central

SNP – Sistema nervioso periférico

TPMPA – Ácido 1,2,5,6 (tetrahidropiridina 4-il)metilfosfínico

TPO - Temporo-parieto-occipital