

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Psicología

# Tesis

Participación de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> de  
la amígdala en la modulación del miedo y la ansiedad

Andrea Gallegos Cari  
Alumna

Dr. Miguel Pérez de la Mora  
Asesor

Licenciatura en Psicología

Febrero 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*Esta tesis está dedicada especialmente a mis padres,  
José Antonio Gallegos Álvarez y  
Viviana Evencia Cari Revilla,  
porque son la razón de mi vida,  
porque siempre están conmigo,  
porque apoyan mis decisiones,  
por el amor y cuidado que he recibido en 25 años de vida,  
porque sin ellos no estaría aquí,  
porque son el motor y la fuerza que me levantan en  
momentos difíciles,  
porque me han demostrado que vale la pena seguir,  
pase lo que pase, que hay mucho que vivir y aprender.*

## Agradecimientos

Gracias a Dios, porque es bueno creer

Gracias a mis hermanos. En estricto orden de aparición: Alejandro, Angélica, Salvador, Miguel y Luis, porque abrieron la brecha para mí y me han dado lo mejor de sus vidas y de sus experiencias. Han estado a cada paso junto a mí, mejorando esta vida.

A mis tíos Teresa Gallegos Álvarez y Juan Manuel González, por su cariño y apoyo.

A mis amigos que son como hermanos, no solo nos une la psicología también el cariño sincero, gracias Jessica, Malinalli, Fabiola, Vero, Lorena y Rafael. Son un ejemplo de dedicación y fortaleza. Me han mostrado que vale la pena empezar cosas nuevas y arriesgar en la búsqueda de nuestros sueños.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha brindado educación de excelencia, pero sobre todo una formación integral y humana.

A mi tutor, Dr. Miguel Pérez de la Mora, por ser el primer contacto que tuve con la investigación científica y que me abrió las puertas de su laboratorio, pero además me abrió las puertas hacia la investigación científica como vocación y convicción, me enseñó que más que un trabajo es un estilo de vida. No olvidare todo lo aprendido en el laboratorio, que se volvió como una segunda casa para mí, lo cual fue un placer.

A Minerva, por la paciencia para enseñar y el apoyo incondicional en cada paso de la realización de esta tesis. Si se pudo Mine.

A Yexel, compañera del laboratorio y amiga invaluable que hizo más leve y agradable el trabajo duro. Gracias de verdad.

A todos los compañeros del laboratorio que estuvieron ahí para apoyarme y animarme: Avril, Josué, Isui, Daniel, Candy, Daniela, Alfredo y Bibiana.

A David por su apoyo absoluto y cariño inefable.

A mis amigas Yazmín, Rebeca, Claudia, Rosa, Marlene y Lourdes, porque la amistad y el cariño han perdurado a lo largo del tiempo.

A mis sinodales por el tiempo y esfuerzo dedicado, por los puntos de vista nuevos que me ayudaron a aprender cosas nuevas y ampliar mi panorama.

Mtra. Gabriela Orozco Calderón

Dr. Oscar Ricardo Galicia Castillo

Dr. José Luis Díaz Meza

Lic. María Eugenia Dorantes Guevara

A mis tutores "honorarios" que también participaron en la construcción de esta tesis con sus acertados comentarios y la motivación para seguir adelante. Gracias Hugo y Emiliano.

A mis compañeros de maestría, Ana, Christian, Tere y Jaime, por su amistad y apoyo.

A la Fundación Alberto y Dolores Andrade, porque es una institución que ha sido una parte muy importante en mi formación académica. Valoro enormemente el apoyo recibido y espero poder regresarles aunque sea un poco de lo que me brindaron.

Gracias por todo.

## Resumen

El miedo y la ansiedad son respuestas biológicamente adaptativas que aparecen cuando un organismo percibe un daño potencial o amenaza. El estudio de estos fenómenos a nivel conductual-experimental es complejo y requiere de modelos especiales que evalúen el comportamiento innato y común a la especie en animales que se someten a condiciones estresantes. Resalta la prueba del enterramiento defensivo, ya que cuenta con una base etológica y amplia validez farmacológica. A nivel del sistema nervioso central, se han descrito posibles estructuras neuronales que participan en el proceso de percepción del estímulo amenazante y en la expresión de la respuesta de miedo, entre ellas sobresale importantemente la amígdala. Esta estructura cuenta con núcleos que reciben la información sensorial (núcleo basolateral) y núcleos que desencadenan la respuesta autonómica y conductual de miedo (núcleo central). El sistema dopaminérgico mesolímbico proyecta una importante cantidad de fibras hacia la amígdala y se han localizado topográficamente receptores dopaminérgicos en sus núcleos. Esta investigación tuvo como propósito estudiar la participación de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  de la amígdala en la respuesta de miedo a través de una prueba conductual de enterramiento defensivo. Para este fin se realizó una microinfusión bilateral en las amígdalas del antagonista de receptores  $D_2$ , raclopride (0, 0.73, 2 y 4  $\mu\text{g/lado}$ ). Los resultados muestran un aumento significativo del tiempo de enterramiento total en la prueba, es decir la inyección de raclopride en dosis de 0.73 y 2  $\mu\text{g/lado}$ , tuvo efectos ansiogénicos en la prueba de enterramiento defensivo, sin alterar la conducta motora.

# Índice

<b>Capítulo 1. Conceptualización y estudio de los fenómenos de miedo y ansiedad: Aproximaciones clínica y experimental</b>	<b>10</b>
1.1. Descripción general de los conceptos de miedo y ansiedad	10
1.2. ¿Son entidades separadas el miedo, la ansiedad y el estrés?	11
1.3. Aproximación clínica: Expresión patológica del miedo y la ansiedad	12
1.3.1 Clasificación de los trastornos de ansiedad	13
1.4. Aproximación experimental del estudio del miedo y de la ansiedad: Modelos animales	16
1.4.1. Criterios de validez y confiabilidad de los modelos animales	17
1.4.2. Modelos animales de miedo y ansiedad	19
1.4.2.1. Modelos conductuales condicionados	20
1.4.2.2. Modelos conductuales no condicionados	20
1.4.3. Consideraciones finales sobre los modelos animales	23
<b>Capítulo 2. El paradigma conductual del enterramiento defensivo</b>	<b>24</b>
2.1. Descripción	24
2.2. Fundamentos biológicos y etológicos	24
2.3. Validez y confiabilidad para el estudio del miedo y la ansiedad	27
2.4. Ventajas	27
2.5. Uso en las neurociencias	28
2.6. Estructuras anatómicas implicadas	28
2.7. Enterramiento defensivo y amígdala	30
<b>Capítulo 3. Sustratos anatómicos y fisiológicos del miedo y la ansiedad. Participación específica de la amígdala</b>	<b>32</b>
3.1. Antecedentes históricos del estudio científico de las emociones	32
3.1.1. Darwin y las emociones	32
3.1.2. Circuito de Papez	33
3.1.3. Teoría del Sistema límbico	33
3.1.4. Síndrome de Kluver-Bucy	34
3.2. Importancia de la amígdala en la modulación del miedo y la ansiedad	35
3.2.1. Descripción estructural de la amígdala	35
3.2.2. Evidencias de la participación de la amígdala en el miedo y la ansiedad	38
3.2.3. De qué manera modula la amígdala el miedo y la ansiedad	39
3.2.4. Bases biológicas del miedo condicionado	46
3.2.5. La amígdala y sus neurotransmisores	48

<b>Capítulo 4. El sistema de neurotransmisión dopaminérgico: Modulador potencial del miedo y la ansiedad</b>	<b>51</b>
4.1. Bases anatómicas y fisiológicas del sistema dopaminérgico	51
4.1.1. Dopamina	51
4.1.2. Vías del sistema dopaminérgico	52
4.1.3. Sinapsis dopaminérgica	55
4.2. Receptores dopaminérgicos	58
4.2.1. Generalidades sobre los receptores ionotrópicos y metabotrópicos	58
4.2.2. Familia de receptores dopaminérgicos	59
4.2.3. Receptores dopaminérgicos tipo D <sub>1</sub>	60
4.2.3.1. Estructura de los receptores D <sub>1</sub>	60
4.2.3.2. Sistemas de transducción	60
4.2.3.3. Localización de los receptores D <sub>1</sub>	61
4.2.3.4. Distribución de receptores D <sub>1</sub> en la amígdala	62
4.2.4. Receptores dopaminérgicos tipo D <sub>2</sub>	63
4.2.4.1. Estructura de los receptores D <sub>2</sub>	63
4.2.4.2. Sistemas de transducción	63
4.2.4.3. Receptores tipo D <sub>2</sub> postsinápticos y presinápticos	65
4.2.4.4. Localización de receptores dopaminérgicos de la familia D <sub>2</sub>	66
4.2.4.5. Distribución cerebral de los receptores tipo D <sub>2</sub>	66
4.2.4.6. Localización de los receptores D <sub>2</sub> en la amígdala	68
4.2.5. Localización de receptores D <sub>3</sub> y D <sub>4</sub>	69
4.3. Papel del sistema dopaminérgico en la modulación del miedo y la ansiedad	70
4.3.1. Acción fisiológica conocida de la dopamina	70
4.3.2. Contribución del sistema dopaminérgico en la modulación del miedo y la ansiedad	70
4.4. Estudio del papel de los receptores dopaminérgicos en la modulación del miedo y la ansiedad	71
4.4.1. Administración sistémica de antagonistas y agonistas de receptores D <sub>1</sub>	71
4.4.2. Participación de la innervación dopaminérgica de la amígdala y sus receptores D <sub>1</sub> en la modulación del miedo y la ansiedad	72
4.4.2.1. Pruebas condicionadas	72
4.4.2.2. Pruebas no condicionadas	73
4.5. Estudio de los receptores D <sub>2</sub> en la modulación del miedo y la ansiedad	74
4.5.1. Administración sistémica de antagonistas y agonistas de receptores D <sub>2</sub> y sus efectos en el miedo y la ansiedad	74
4.5.1.1. Pruebas condicionadas	75
4.5.1.2. Pruebas no condicionadas	75
4.5.2. Participación de la innervación dopaminérgica de la amígdala y sus receptores D <sub>2</sub> en la modulación del miedo y la ansiedad	77

<b>Capítulo 5. Justificación y objetivos</b>	<b>81</b>
5.1. Justificación	81
5.2. Objetivo general	82
5.3. Objetivos particulares	82
5.4. Pregunta de investigación	82
5.5. Hipótesis general	83
5.6. Hipótesis particulares	83
<b>Capítulo 6. Método</b>	<b>84</b>
6.1. Variables	
6.1.1. Variable independiente	84
6.1.2. Variables dependientes	84
6.1.3. Variables extrañas	86
6.2. Diseño de investigación	87
6.3. Sujetos	88
6.4. Escenario	88
6.5. Equipo y material	88
6.5.1. Caja de enterramiento defensivo	88
6.5.2. Caja de campo abierto	89
6.5.3. Fármaco	89
6.6. Procedimiento	90
6.6.1. Cirugía	90
6.6.2. Habitación	90
6.6.3. Micro-infusión intra-amigdalina	91
6.6.4. Prueba de enterramiento defensivo	91
6.6.5. Prueba de campo abierto	92
6.6.6. Análisis histológico	92
6.6.7. Análisis estadístico	93
6.6.8. Consideraciones éticas	94
<b>Capítulo 7. Resultados</b>	<b>95</b>
7.1. Análisis histológico	95
7.2. Análisis conductual en la prueba del enterramiento defensivo	99
7.2.1. Tiempo de enterramiento	99
7.2.2. Latencia de enterramiento	102
7.2.3. Episodios de enterramiento	104
7.2.4. Altura del aserrín	106
7.2.5. Número de choques recibidos	108
7.2.6. Aproximaciones al electrodo	110
7.3. Evaluación motora en la prueba de campo abierto	112

<b>Capítulo 8. Discusión</b>	<b>113</b>
8.1. Comparación con datos de la literatura	115
8.2. Distribución de los receptores D <sub>2</sub> en la amígdala	116
8.3. Sitio anatómico de acción del raclopride dentro de la amígdala	117
8.4. Posibles mecanismos involucrados en los efectos de la administración intra-amigdalina del raclopride sobre el miedo y la ansiedad	118
8.5. Limitaciones	120
8.6. Perspectivas	121
<b>Capítulo 9. Conclusión</b>	<b>123</b>
<b>Glosario</b>	<b>125</b>
<b>Referencias</b>	<b>129</b>

# Capítulo 1

## Conceptualización de los fenómenos de miedo y ansiedad: Aproximación clínica y experimental

### 1.1. Descripción general de los conceptos de miedo y ansiedad

Conocer nuevas personas, hablar ante un público, acudir a una cita o entrevista importante, presentar un examen, sufrir un asalto, no encontrar trabajo... Todas estas situaciones tienen algo en común, coloquialmente dicho: “nos ponen los nervios de punta”; ciertamente, a otros más y a otros menos, sin embargo son ejemplos de situaciones que, ya sea porque sabemos muy bien con que nos vamos a enfrentar o por que el peligro sea desconocido, de igual forma nos han llegado a producir cierto grado de miedo y/o ansiedad.

Fisiológicamente, cuando un individuo (humano o animal) siente amenazada su integridad (física o psicológica), genera una serie de manifestaciones entre las que se incluyen:

- *Respuestas autónomas.* Incremento de la frecuencia cardiaca, elevación de la presión arterial, palidez, aumento de la frecuencia respiratoria, hiperactividad de las glándulas sudoríparas, incremento o disminución de la motilidad intestinal.
- *Respuestas endócrinas.* Elevación de los niveles sanguíneos de cortisol, adrenalina y noradrenalina.
- *Respuestas musculares y reflejas.* Manifestadas por un aumento de la tensión muscular y de los reflejos músculo-tendinosos tendientes a preparar a un individuo para la lucha o la huida.
- *Respuestas conductuales.* Observables en forma de inhibición motora, inquietud, agitación, huida o agresión.

Todas estas respuestas están destinadas a preparar al sujeto a encarar la situación que lo amenaza. Al pasar la situación de emergencia, el sujeto se tranquiliza, regulariza sus constantes fisiológicas y regresa a la homeostasis (Macías Fernández y Alonso del Teso, 1998; Pérez de la Mora et al., 2007a).

Por lo tanto, el miedo y la ansiedad son mecanismos naturales de afrontamiento que aparecen cuando la homeostasis del individuo se ve amenazada por un peligro real o potencial, los cuales evolutivamente han perdurado en todas las especies del reino animal, ya que ofrecen una ventaja biológica para la supervivencia (LeDoux, 1996; Heinze, 2003).

## **1.2. ¿Son entidades separadas el miedo, la ansiedad y el estrés?**

Las diferencias entre miedo y ansiedad son difíciles de establecer. Desde el punto de vista fisiológico, el miedo y la ansiedad tienen síntomas y signos muy similares. La diferencia fundamental radica únicamente en el grado de definición con el que se percibe el estímulo que los produce (Pérez de la Mora et al., 2007a).

**El miedo** es definido como un estado motivacional que surge ante un objeto externo al sujeto, que es real, ubicable e implica un peligro inminente para el individuo (LeDoux, 1996; Rojas, 2001; Steimer, 2002; Heinze, 2003).

**La ansiedad** es un estado del organismo que se da ante una amenaza desconocida, vaga o indefinida, que incluso puede no estar presente (LeDoux, 1996; Rojas, 2001; Steimer, 2002; Heinze, 2003).

De acuerdo a esto, si conceptualmente un individuo que se enfrenta a un león podría experimentar miedo a perder su vida, también podría experimentar ansiedad ante la incertidumbre sobre la manera como esto podría ocurrir, la separación clínica de ambas entidades en ese momento de peligro sería totalmente imposible (Pérez de la Mora et al., 2007a).

Tanto en humanos como en animales la respuesta ante una amenaza es muy similar (Debiec y LeDoux, 2004). En el caso del humano podríamos definir mediante un reporte verbal si la ubicación del estímulo es vaga o concreta, pero en los animales, es difícil asegurar si el sujeto percibe un estímulo amenazante como concreto o indefinido. Lo que sí puede observarse y medirse es el amplio repertorio conductual y las respuestas fisiológicas que aparecen cuando el animal es expuesto a diversas situaciones amenazantes (LeDoux, 1996; Rojas, 2001; Steimer, 2002; Heinze, 2003). Por lo tanto, en este trabajo realizado con animales, ante la dificultad de diferenciar entre estas entidades, el miedo y la ansiedad se considerarán términos sinónimos y se hará referencia a ellos como miedo y ansiedad. De hecho, los signos y síntomas que se observan en ambas entidades son tan similares que probablemente miedo y ansiedad sean sólo variantes de un sistema único de alerta (Pérez de la Mora et al., 2007a).

Por otro lado, el término estrés se refiere, de acuerdo a la Enciclopedia Británica, “a cualquier tensión o interferencia que perturba el funcionamiento de un organismo”. Dado que un individuo sujeto a estrés psicológico presenta manifestaciones clínicas similares a las que se ven en la ansiedad y el miedo, y que los estímulos que le generan tensión pueden o no ser identificables con claridad, el estrés se definiría como una serie de episodios de ansiedad y miedo que se suceden y mezclan en el tiempo, y en el que sus mecanismos al operar continuamente perturban el funcionamiento del organismo (Pérez de la Mora et al., 2007a).

### **1.3. Aproximación clínica: Expresión patológica del miedo y la ansiedad**

El miedo y la ansiedad son reacciones normales ante el peligro (real o imaginario). Los cuales, en sí mismos no son condiciones patológicas (LeDoux, 1996). Estos mecanismos funcionan de forma adecuada cuando se da una

respuesta proporcionada entre el estímulo y la respuesta, pero puede llegar a ser patológica cuando:

- La respuesta se desencadena ante un estímulo o situación objetivamente irrelevante; es decir, que la respuesta es desproporcionada con respecto al estímulo que la provoca (LeDoux, 1996; Macías Fernández y Alonso del Teso, 1998).
- La respuesta se produce de forma innecesaria, recurrente y persistente en el tiempo (LeDoux, 1996; Macías Fernández y Alonso del Teso, 1998).
- Este estado interfiere con la vida cotidiana del individuo (LeDoux, 1996).

### *1.3.1. Clasificación de los trastornos de ansiedad*

El DSM-IV-TR (Manual de Diagnóstico y Estadística de los Trastornos Mentales de la Asociación de Psiquiatría Americana versión IV revisada) tiene un apartado especial para los trastornos de ansiedad (tabla 1). Para diagnosticar un trastorno de ansiedad, según este manual se toman en cuenta los siguientes síntomas:

- Palpitaciones, sacudidas del corazón o elevación de la frecuencia cardíaca.
- Sudoración.
- Temblores o sacudidas.
- Sensación de ahogo, falta de aliento o atragantamiento.
- Opresión o malestar torácico.
- Náuseas o molestias abdominales.
- Inestabilidad, mareo o desmayo.

- Desrealización (sensación de irrealidad) o despersonalización (estar separado de uno mismo).
- Miedo a perder el control, volverse loco o miedo a morir.
- Parestesias (sensación de entumecimiento u hormigueo).
- Escalofrío o sofocaciones.

A esto, se suman en ocasiones, numerosos síntomas de evitación y la presencia de diversos tipos de obsesiones y compulsiones (Pérez de la Mora et al., 2007a).

Los desórdenes de ansiedad son los trastornos psiquiátricos más comunes en la población, con una incidencia del 18.1% y una prevalencia a lo largo de la vida de 28.8% (Garakani et al., 2006). En la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica realizada en 2003 se encontró que los trastornos de ansiedad son los más frecuentes en la población mexicana (14.3% alguna vez en la vida), seguidos por los trastornos por uso de sustancias (9.2%) y los trastornos afectivos (9.1%). Es interesante que la región conformada por las tres áreas metropolitanas más grandes del país (Ciudad de México, Guadalajara y Monterrey) muestran la prevalencia más elevada de trastornos de ansiedad (3.4%). También es notable que solo 1 de cada 10 sujetos adultos con algún trastorno mental recibieron atención (Medina-Mora et al., 2003).

Clínicamente, los trastornos de ansiedad se clasifican según el conjunto de signos y síntomas presentes, su etiología y frecuencia de aparición a través del tiempo. En la tabla 1 se presenta esta clasificación.

**Tabla 1.** *Clasificación de los trastornos de ansiedad y sus criterios de diagnóstico según el Manual Estadístico y Diagnóstico de Trastornos Mentales IV-TR (2003).*

Nombre del trastorno	Criterios diagnósticos
Crisis de angustia o pánico	Períodos breves y aislados en donde se experimenta miedo y malestar intensos, usualmente acompañados de elevación de la frecuencia cardíaca, sudoración, temblores, sensación de ahogo, malestar torácico, molestias abdominales, sensación de irrealidad, despersonalización, miedo a perder el control, volverse loco o morir.
Agorafobia	Miedo patológico a presentar crisis de angustia o síntomas relacionados en situaciones en las que escapar puede resultar difícil.
Fobia específica	Temor acusado y persistente a exponerse a un objeto o situación específicos que provocan una respuesta inmediata de miedo, que puede tomar la forma de una crisis de angustia.
Fobia social	Temor por una o más situaciones sociales o actuaciones en público en las que se teme actuar de un modo que sea humillante o embarazoso.
Trastorno obsesivo-compulsivo	En este trastorno se presentan obsesiones (es decir, pensamientos persistentes que causan ansiedad o malestar), o compulsiones (es decir, comportamientos de carácter repetitivo) que se ven obligados a realizar para reducir el malestar o prevenir algún acontecimiento negativo.
Trastorno por estrés post-traumático (TEPT)	Los individuos con este trastorno han estado expuestos a un acontecimiento traumático en donde han experimentado amenazas a su integridad física. Existe una re-experimentación del evento y una activación tal que no permite conciliar el sueño, concentrarse, ataques de ira, hipervigilancia y evitación.
Trastorno por estrés agudo	Similar al trastorno de estrés post-traumático, pero con menor duración (2 días a 4 semanas).
Trastorno de ansiedad generalizada	Ansiedad y preocupación excesivas sobre una amplia gama de acontecimientos o actividades que no se pueden controlar.
Trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica	Se presenta ansiedad prominente, crisis de angustia, que parecen ser la consecuencia fisiológica directa de una enfermedad médica.
Trastorno de ansiedad inducido por sustancias	Está presente ansiedad de carácter prominente, crisis de angustia, durante la intoxicación o abstinencia de una sustancia o medicamento. Ej. Alcohol, cafeína, cannabis, sedantes, etc.

Dado que los trastornos de la ansiedad son cada vez más frecuentes resulta de capital importancia entender, explicar y proponer soluciones para ellos. Una plataforma muy importante de la cual partir para la comprensión de estos trastornos está dada por el estudio de su neurobiología, pues al entender como ocurren estos procesos en el cerebro (ya sea de animales o humanos), esto permitirá tratarlos adecuadamente. Por razones éticas, cuando la investigación no se puede realizar en seres humanos, es válido el uso de animales de laboratorio para determinar aquello que se quiere saber y posteriormente extrapolarlo con las debidas proporciones al conocimiento del ser humano (LeDoux, 2000; Contreras et al. 2003; Garakani et al. 2006).

#### **1.4. Aproximación experimental al estudio del miedo y de la ansiedad: Modelos animales**

Del surgimiento de una diversidad de fármacos con supuestas propiedades ansiolíticas y de la imposibilidad de probarlos directamente en el ser humano por razones éticas, surgió la necesidad de crear pruebas o modelos animales, en los cuales se pudieran estudiar los efectos terapéuticos potenciales de estas nuevas sustancias, así como para investigar la neurobiología del fenómeno de la ansiedad. La idea es usar preparaciones experimentales desarrolladas para una especie con el propósito de entender el mismo fenómeno en otra especie (McKinney y Bunney, 1969 en Belzung y Griebel, 2001).

La idea anterior tiene apoyo en las observaciones de Darwin (1873 en Dalglish, 2004), quién señaló que las emociones no son privativas de los humanos, sino que también se observan en los animales, aunque dependiendo de la especie éstas adquieren modalidades diferentes.

Ratas y humanos comparten más del 90 % de sus genes y se ha visto que estos modelos son una herramienta útil en la psicología comparada. No es fácil

escoger un modelo animal que refleje exactamente el fenómeno que se desea estudiar, pues existen algunos aspectos a considerar como las diferencias en el sistema nervioso humano y no humano, la dificultad en determinar analogías conductuales entre las especies y la necesidad de extrapolar los resultados obtenidos en animales a los humanos (Kalueff y Tuohimaa, 2004).

#### *1.4.1. Criterios de validez y confiabilidad de los modelos animales*

A la par de la creación de modelos conductuales en animales, se han desarrollado criterios de confiabilidad que avalan que el modelo realmente esté midiendo lo que se quiere medir. Para que un paradigma animal pueda ser utilizado como modelo de una determinada conducta humana, debe existir al menos una analogía entre lo que ocurre en el modelo y lo que sucede en la vida real. Aunque los modelos por definición son solamente un símil de la realidad, para tener valor heurístico y predictivo deben cumplir con los siguientes requisitos:

- **Validez predictiva.** Se refiere a que el modelo animal debe ser sensible ante agentes farmacológicos que son efectivos clínicamente para disminuir la ansiedad, es decir ansiolíticos. De igual forma los compuestos con acciones opuestas deben tener efectos ansiogénicos y los agentes que no tienen efectos en la clínica tampoco deben tenerlos en la prueba (*criterio terapéutico de McKinney y Bunney, 1969 en Belzung y Griebel, 2001*). Adicionalmente, debe existir una correlación farmacológica dosis-dependiente, debe haber selectividad conductual y ausencia de tolerancia en el modelo. Aunque el criterio de validez predictiva parece satisfactorio, se deben tomar ciertas reservas y corroborar el modelo con otros criterios, pues se han observado diferencias en la farmacocinética y en la farmacodinamia entre especies (Belzung y Griebel, 2001; DeBoer y Koolhaas, 2003)

- **Validez de cara, aparente o isomorfismo (“face validity”).** Este criterio implica que las respuestas de miedo y ansiedad observadas en el modelo animal son idénticas a las respuestas fisiológicas y conductuales vistas en los humanos (*criterio sintomatológico* de McKinney y Bunney, 1969 en Belzung y Griebel, 2001). Ello supone que la expresión de una emoción dada es similar entre especies. Esto es válido por lo que toca a la expresión autónoma del miedo y la ansiedad, pues el aumento de la frecuencia cardiaca, de la presión arterial, de la temperatura, etc., se observan tanto en los humanos como en una gran diversidad de especies. Sin embargo, las respuestas conductuales propiamente dichas varían enormemente entre ellas, pues mientras los roedores huyen, atacan o se congelan, los peces nadan, los pájaros vuelan y los humanos corren. En la respuesta está implícito que, independientemente de su modalidad, ella está dirigida a alejar al sujeto del estímulo que la provoca. De hecho, la posibilidad de un isomorfismo de conductas animales y humanas tiene que ser puesta en el contexto de la teoría de la evolución, sugiriendo que un determinado patrón conductual será elegido según su valor para la sobrevivencia de la especie. Es importante, entonces, destacar que la selección natural opera por las consecuencias de la conducta, no por la conducta *per se*, y que el isomorfismo estaría dado, no en razón del patrón conductual por sí mismo, sino en función de sus consecuencias en la conducta (Belzung y Griebel, 2001; DeBoer y Koolhaas, 2003).
- **Validez de constructo.** Este criterio se refiere a las semejanzas que deben existir entre el modelo animal y la conducta humana, respecto a las condiciones inductoras (*criterio etiológico* de McKinney y Bunney, 1969 en Belzung y Griebel, 2001) y los mecanismos neurobiológicos que le subyacen (*criterio bioquímico* de McKinney y Bunney, 1969 en Belzung y Griebel, 2001). Es evidente que la evaluación de un estímulo como amenazante varía según la especie, pero el punto importante es que este resulte en una amenaza para la homeostasis del individuo,

independientemente de la especie (Belzung y Griebel, 2001; DeBoer y Koolhaas, 2003).

Es importante considerar que los datos obtenidos bajo estos criterios son válidos en el grado en que el modelo sea válido.

#### *1.4.2. Modelos animales de miedo y ansiedad*

Los modelos de miedo y ansiedad se basan en la capacidad de los animales para responder ante un estímulo que reconocen como ajeno o potencialmente peligroso. De manera particular, el miedo y la ansiedad en los animales se acompaña de alteraciones de conducta que tienden a ser extremas, ya sea incrementando la locomoción del animal o bien provocándole un “congelamiento” conductual. Las respuestas endócrinas y autónomas van desde un aumento en la frecuencia cardíaca, en la temperatura corporal y en el nivel de adrenalina, noradrenalina y cortisol en la sangre, hasta el desarrollo de úlceras gástricas (Benelli et al., 2000; Carrive, 2000).

Los modelos más aceptados son aquéllos en los que las situaciones a las que se enfrentan los animales con los que se experimenta son muy parecidas a situaciones que enfrentan en la vida real. Cabe señalar que, aún cuando los animales empleados en los modelos de ansiedad han sido criados y mantenidos en un ambiente artificial y nunca se han enfrentado a las situaciones que experimenta un animal silvestre en su hábitat natural, éstos animales ante un estímulo ansiogénico exploran, entierran objetos, nadan, trepan y saltan de manera similar a como lo hace un animal silvestre de la misma especie. En términos generales se puede dividir a los modelos de ansiedad en dos grandes grupos: en el primero, el modelo involucra respuestas condicionadas y en el segundo se estudian conductas innatas no condicionadas.

#### *1.4.2.1. Modelos conductuales condicionados*

El término condicionado se refiere a un proceso llamado condicionamiento clásico, que ocurre cuando un estímulo neutral (tono, luz, etc.) es seguido de manera regular por otro que es dañino o aversivo (ej. un choque eléctrico). Después de varias repeticiones de este proceso se puede lograr una respuesta emocional condicionada aunque ya no se aplique el estímulo nocivo, bastará con que el animal perciba el estímulo condicionado, antes neutral, para responder emocionalmente. Los modelos condicionados (tabla 2) permiten un control muy preciso de la conducta que se mide, pero requieren de un entrenamiento muy extenso de los animales y un control muy cuidadoso de las posibles interacciones y/o efectos no específicos del tratamiento con el aprendizaje, la memoria, el apetito y las funciones perceptuales (LeDoux, 2000; Maren, 2001; Debiec y LeDoux, 2004).

#### *1.4.2.2. Modelos conductuales no condicionados*

Existe otra clase de modelos que tienen bases etológicas y se caracterizan por situar al animal en circunstancias que se asemejan a lo que podría ocurrirle espontáneamente a un individuo de su especie en su ambiente natural. Estos modelos son llamados no condicionados, ya que no involucran el entrenamiento de los animales y son menos susceptibles a ser influidas por procesos mnemotécnicos y motivacionales, pues son de ensayo único (Rodgers, 1997). Sin embargo, a pesar de su aparente simplicidad, dado que en estos modelos se miden cambios sobre la condición basal de los animales, las pruebas usadas son más propensas a mostrar una mayor variabilidad en las conductas medidas y a ser influidos por los efectos del tratamiento sobre la actividad motora del animal. Entre los más usados destacan el laberinto elevado en forma de "+", la caja luz/oscuridad, el enterramiento defensivo producido por un choque y la prueba de interacción social, descritos en la tabla 3.

**Tabla 2.** Descripción de las principales pruebas conductuales condicionadas para medir el miedo y la ansiedad.

Prueba condicionada	Descripción
Prueba de conflicto de Vogel y Prueba de conflicto Geller-Seifter	Ambas pruebas consisten en privar al animal de agua o comida por un periodo relativamente prolongado. Una vez que los animales tienen gran necesidad de estos elementos, se les presentan asociados a estímulos negativos como un choque eléctrico. El animal desarrolla el conflicto entre alimentarse o recibir un choque eléctrico. Los fármacos ansiolíticos, principalmente benzodiazepinas, tienen claros efectos anti-conflicto, y los animales ingieren el alimento a pesar del castigo. (Fernández-Guasti y López-Ruvalcaba, 2004; Millan, 2003)
Supresión condicionada	Inicialmente es necesario establecer una línea base de conducta mediante un programa de refuerzo de intervalo variable. Posteriormente, se administra un estímulo condicionado (sonido o luz) seguido por una breve descarga eléctrica en las patas del animal. Generalmente, el animal se congela y deja de responder a la palanca (supresión condicionada). Después de cierto número de ensayos, la sola aparición de la luz o el sonido producen la inmovilización. La magnitud de esta supresión condicionada da la medida del aprendizaje obtenido (Salgado et al., 2000).
Aversión condicionada a un lugar	En el condicionamiento de lugar se evalúa la preferencia o aversión hacia un contexto asociado previamente con un estímulo positivo o negativo, inferido por el tiempo de permanencia en ese lugar, en comparación con otro asociado a un estímulo neutral (Mead et al. 2008; Kamenetzky et al., 2007)
Congelamiento inducido por el miedo	Se asocia un estímulo incondicionado (luz o sonido) con la recepción inmediata de un choque eléctrico. Después de lograr la asociación del estímulo condicionado, se mide el tiempo que la rata responde con la conducta de congelamiento o inmovilización, definida esta como ausencia de cualquier movimiento, excepto los necesarios para respirar (Guarraci et al., 2000).
Enterramiento defensivo condicionado	Consiste colocar al roedor en una caja de acrílico, cuyo piso está cubierto de aserrín. De una de las paredes sobresale un electrodo por el que circula una corriente eléctrica constante, cuando el animal recibe un choque eléctrico exhibe la conducta de enterramiento. En el caso del enterramiento condicionado, se somete al animal un día después al mismo paradigma (el electrodo sin electrificar) para corroborar si se dio algún tipo de aprendizaje. Entre otros parámetros, se mide el tiempo y la frecuencia de enterramiento (Lehmann et al., 2005; Lehmann et al., 2006).
Sobresalto potenciado por el miedo	Esta prueba consiste en exponer a la rata a un condicionamiento entre una señal luminosa y la administración de un choque eléctrico. Una vez que se ha formado esta asociación, se coloca al animal dentro la caja de aprendizaje, pero no se le da el choque, sino que se le presenta un estímulo acústico muy potente. La idea es que al asociar la rata la luz con el choque, presenta un tipo de miedo condicionado porque espera que también se presente estímulo aversivo, en vez de eso se le aplica un estímulo acústico de gran intensidad que por sí mismo sobresalta la rata, pero que aplicado en esta fase de expectativa aumenta aún más. Se mide el nivel del sobresalto en la rata y se ha observado que diversas sustancias lo disminuyen (Greba et al., 2001).

**Tabla 3.** Descripción de las principales pruebas conductuales **no** condicionadas para medir el miedo y la ansiedad.

Prueba condicionada	Descripción
<i>Caja luz-oscuridad</i>	En la caja luz/oscuridad se estudian patrones de actividad exploratoria espontánea en los individuos expuestos a condiciones de iluminación diferentes y se mide el tiempo que pasan en el área segura (la parte oscura de la caja) o la insegura (la parte iluminada de la caja) (Gómez et al., 2002).
<i>Laberinto elevado en forma de “+”</i>	El laberinto elevado en forma de “+” explota el miedo innato de los roedores a los espacios abiertos. El dispositivo usado es un laberinto con dos brazos abiertos y dos cerrados que se interceptan en un cuadrado central. El laberinto está elevado del suelo mediante un pedestal que se une al cuadrado central. Durante la prueba se introduce al animal en el centro del laberinto y se le observa durante un periodo de cinco minutos. Se mide el porcentaje de entradas y del tiempo transcurrido en ambos brazos se toma la exploración de los brazos abiertos como una medida de ansiedad (Pellow et al., 1985; Carobrez y Bertoglio, 2005).
Interacción social	La prueba de interacción social se basa en la observación de que el tiempo invertido por parejas de ratas machos del mismo peso, en una relación social activa (es decir acicalarse, explorarse, olerse) se reduce a medida que aumenta la iluminación o el desconocimiento del lugar (condiciones ansiogénicas) (File y Seth, 2003).
Vocalizaciones ultrasónicas	Cuando las crías son aisladas de su madre o de individuos conespecíficos, emiten vocalizaciones ultrasónicas. La exposición a fármacos ansiolíticos reduce la frecuencia de tales vocalizaciones (Wang et al., 2008).
<i>Enterramiento defensivo</i>	Consiste colocar al roedor en una caja de acrílico, cuyo piso está cubierto de aserrín. De una de las paredes sobresale un electrodo por el que circula una corriente eléctrica constante. Cuando el animal recibe un choque eléctrico se retira del electrodo e inicia una conducta de enterramiento dirigida a ocultarlo. Entre otros parámetros, se mide el tiempo y la frecuencia de enterramiento (DeBoer y Koolhaas, 2003; Pinel y Treit, 1978).

### *1.4.3. Consideraciones finales sobre los modelos animales*

No existe un modelo único capaz de abarcar todos los aspectos del miedo y la ansiedad, tanto los modelos animales condicionados como los no condicionados presentan limitaciones y ventajas en cuanto a su uso. Por un lado, en los modelos condicionados los animales son expuestos a estímulos no habituales o artificiales, por lo que es necesario un entrenamiento previo y son susceptibles de sufrir la interferencia de procesos de aprendizaje y memoria; por el otro, los modelos no condicionados muestran mayor variabilidad en los valores conductuales basales y el análisis conductual resulta más complejo. Posiblemente, los modelos no condicionados con base etológica son especialmente útiles para el estudio de la neurobiología del miedo y la ansiedad, y los modelos condicionados convengan más en el estudio del estado ansioso patológico o aprendido, por ejemplo el trastorno de ansiedad por estrés post-traumático.

Aunque el repertorio conductual es amplio, la observación del comportamiento de los roedores ante un estímulo amenazante muestra que algunas respuestas son similares y ocurren de forma espontánea, entre estas conductas se encuentra la acción de arrojar tierra u otro material en dirección a la amenaza, fenómeno conocido como enterramiento defensivo. Basándose en esta observación, se implementó el modelo de enterramiento defensivo como prueba conductual para el estudio de la neurofarmacología del miedo y la ansiedad, cuestión que se abordará ampliamente en el siguiente capítulo.

## Capítulo 2

### El paradigma conductual del enterramiento defensivo

#### **2.1. Descripción del paradigma de enterramiento defensivo**

El enterramiento defensivo es un modelo animal de evaluación conductual utilizado para medir el miedo y la ansiedad en roedores. El aparato utilizado es una caja de experimentación hecha de acrílico transparente (27 X 16 X 23 cm) con una cama de aserrín de 5 cm de grosor. En una pared adyacente y 2 cm arriba de la cama de aserrín se encuentra fijo un electrodo de 7 cm de largo y 0.5 cm de diámetro. El principio de la prueba consiste en colocar al animal dentro de la caja y permitir que la explore libremente. Eventualmente, cuando el animal encuentra y toca el electrodo con una parte de su cuerpo (nariz, hocico, cola o patas) recibe una descarga eléctrica de baja intensidad. Después de numerosas observaciones se ha constatado que el roedor tiende a responder lanzando el aserrín con sus patas delanteras hacia el electrodo o cualquier elemento dentro de la caja que pueda potencialmente provocarle daño, enterrándolo (ver figura 1). La sesión es videograbada de 10 a 15 minutos para su posterior evaluación etológica (Treit et al., 1994; Pérez de la Mora et al., 2006).

#### **2.2. Fundamentos biológicos y etológicos**

El enterramiento defensivo es un paradigma conductual que tiene como objetivo reproducir en un ambiente controlado lo que sucede de forma cotidiana en la vida del roedor, cuando éste se enfrenta a un estímulo aversivo. Desde 1950, Hudson (en De Boer y Koolhaas, 2003) relató que cuando un objeto o un sujeto agredía de algún modo a una rata, ésta respondía con patrones de conducta estereotipados, entre los que se encuentran la huida, el congelamiento, el ataque y el enterramiento del estímulo dañino. La conducta de enterramiento también ha sido observada en ardillas que lanzaban arena directamente cuando se les

acercaba una serpiente (Swaisgood et al., 1999) y en ratones que fueron expuestos a un escorpión vivo. Estas observaciones apoyan la propuesta de que el enterramiento es una conducta natural de los roedores (Londei et al., 1998).



[www.intelli-bio.com](http://www.intelli-bio.com)

**Figura 1. Modelo conductual de enterramiento defensivo.** En este modelo, el objeto dañino está constituido por un electrodo permanentemente electrificado que da choques eléctricos cada vez que la rata lo toca con sus patas u hocico. Observe en la figura, como la rata que ha recibido un choque eléctrico se ha retirado del electrodo (no visible en la figura, por estar parcialmente tapado) y lo está enterrando con aserrín que impulsa con sus patas delanteras.

Sin embargo, fueron Pinel y Treit (1978), quienes introdujeron el paradigma de enterramiento defensivo en el campo de estudio de las neurociencias y la psicofarmacología. Como se describió anteriormente, el paradigma consiste en exponer al animal a un ambiente para que lo explore libremente, pero que incluye un electrodo que al tocarlo descarga una corriente eléctrica de aproximadamente 0.4 mA. Después de administrar el choque se evalúan las manifestaciones conductuales y cambios fisiológicos descritos en la tabla 4. A nivel neuroendocrino se ha reportado un aumento de los niveles de corticosterona, noradrenalina, adrenalina y ACTH en plasma, durante la exposición al electrodo. Las muestras

se obtienen generalmente mediante la extracción de sangre con una cánula en la vena yugular en el momento que ocurre la prueba (Sgoifo et al., 1996; Groenink et al., 1997; Bondi et al., 2007). Sin embargo, cabe mencionar que los parámetros conductuales más frecuentemente medidos son únicamente la latencia al primer episodio de enterramiento, la conducta de enterramiento propiamente dicha y el número de choques eléctricos recibidos.

**Tabla 4.** *Manifestaciones conductuales y fisiológicas frecuentemente evaluadas en el paradigma de enterramiento defensivo.*

Manifestaciones conductuales	Manifestaciones fisiológicas endocrinas y autónomas
<p>Medición de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Frecuencia de episodios y tiempo de enterramiento.</li> <li>• Latencia para iniciar el primer episodio de enterramiento.</li> <li>• Altura del aserrín que cubre al electrodo.</li> <li>• Reactividad al choque.</li> <li>• Contactos directos con el electrodo.</li> <li>• Aproximaciones o acercamientos al electrodo.</li> <li>• Reacción conductual ante el choque.</li> <li>• Periodos de congelamiento</li> <li>• Acicalamiento</li> <li>• Ambulación</li> </ul>	<p>Aumento de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Frecuencia cardíaca.</li> <li>• Presión arterial.</li> <li>• Temperatura corporal.</li> <li>• Noradrenalina en plasma.</li> <li>• Adrenalina en plasma.</li> <li>• Corticosterona en plasma.</li> <li>• Prolactina en plasma.</li> <li>• Glucosa en plasma.</li> </ul>

*(Adaptado de DeBoer y Koolhaas, 2003)*

### **2.3. Validez y confiabilidad para el estudio del miedo y la ansiedad**

El modelo conductual de enterramiento defensivo cumple con varios criterios de validez para el estudio del miedo y la ansiedad. Para empezar fármacos clínicamente útiles como ansiolíticos como las benzodiazepinas, entre las que se encuentran clordiazepóxido (Treit y Fundytus, 1988) y midazolam (Treit, 1990) disminuyen significativamente el enterramiento defensivo, al igual que lo hacen algunos conocidos ansiolíticos serotoninérgicos como la buspirona (Treit y Fundytus, 1988), ipsapirona (Korte y Bohus, 1990), 8-OH-DPAT (Picazo et al., 2006), EMD-68843 (Treit et al., 2001), y la fluoxetina (Degroot y Nomikos, 2005). Esta inhibición de la conducta de enterramiento ocurre de forma dosis-dependiente y con una potencia relativamente similar a la acción clínica en humanos. Cabe aclarar que la disminución del enterramiento no parece ser el resultado de sedación, alteración motriz (Treit y Fundytus, 1988) o analgesia (Treit, 1990). Por otro lado, también se han encontrado que agentes ansiogénicos como el DMCM (metil-6,7-dimetoxi-4-etil-beta-carbolina-3-carboxilato), que es un agonista inverso de los receptores a benzodiazepinas (DeBoer y Koolhass, 2003) y el stressin1-A (Zhao et al. 2007) aumentan el enterramiento, indicando que esta prueba es capaz de detectar efectos ansiogénicos. Tales datos farmacológicos proporcionan la evidencia suficiente para sugerir que el enterramiento defensivo es una prueba confiable para evaluar el miedo y la ansiedad, ya que puede ser suprimida por agentes ansiolíticos y aumentado por agentes ansiogénicos (Treit et al., 1994).

### **2.4. Ventajas**

La respuesta de enterramiento defensivo se distingue favorablemente de otros índices experimentales de miedo y ansiedad porque es una respuesta fácil de cuantificar que aparece en cualquier tipo de roedor sin importar su experiencia previa y no requiere de entrenamientos complejos. Bajo los parámetros adecuados es una respuesta robusta y confiable, ya que aparece incluso después de un sólo

choque y está dirigida hacia el estímulo aversivo, es decir, al electrodo, Estos datos sugieren que el enterramiento defensivo es una respuesta defensiva instintiva que está dirigida hacia objetos amenazantes, convirtiéndola en una herramienta útil para la psicología comparada (Treit et al., 1994).

## **2.5. Uso en las neurociencias**

El enterramiento es una reacción clara de miedo no aprendido en los roedores, se presenta en ambientes naturales e incluso en el ambiente “artificial” de un laboratorio sin importar la especie, cepa, sexo o edad de los roedores (DeBoer y Koolhass, 2003). Por lo que respecta a su aparición en el campo de las neurociencias, el modelo conductual de enterramiento defensivo ha demostrado ser una herramienta eficaz en el estudio del efecto y los mecanismos de acción de fármacos ansiolíticos, de las bases neurales del miedo y la ansiedad condicionados o no condicionados de sus correlatos neuroendocrinos (Treit et al., 1994).

El enterramiento defensivo condicionado consiste en someter al roedor al procedimiento antes descrito, pero además de medir el primer ensayo, después de un tiempo de reposo (horas o días) se le somete a la prueba de nuevo, es decir a un segundo ensayo, en donde se corrobora si el animal aprendió o si la experiencia del primer ensayo influye en la conducta que presenta en el segundo. Se miden los mismos índices conductuales, pero ahora son interpretados desde el punto de vista del aprendizaje. Generalmente este modelo es usado para medir las bases anatómicas y fisiológicas de los fenómenos de aprendizaje emocional aversivo (Lehmann et al., 2006; Lehmann et al., 2005).

## **2.6. Estructuras anatómicas implicadas**

Una revisión de la literatura muestra que por medio del enterramiento defensivo se han descrito diversas estructuras anatómicas cerebrales que

participan en los fenómenos de miedo y ansiedad. Principalmente, se han estudiado el septum, el hipocampo, corteza prefrontal y en menor medida el hipotálamo, el fórnix y la amígdala.

**a) *Septum.*** Se encuentra ubicado en la parte medial de los hemisferios cerebrales. Esta región cerebral ha sido ampliamente estudiada mediante el enterramiento defensivo. Cuando se lesiona de forma electrolítica (Treit y Menard, 1997; Menard y Treit, 1996; Treit et al., 1993a) o de forma excitotóxica (Pesold y Treit, 1992), la conducta de enterramiento se ve disminuida. De forma más específica, inyecciones locales en el *septum lateral* de antagonistas alpha y beta adrenérgicos (Bondi et al., 2007), muscimol (Degroot et al., 2001), pregnanolona (Bitrân et al., 1999), el agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT (Menard y Treit, 1998) o midazolam (Pesold y Treit, 1996; Pesold y Treit, 1994) disminuyen el tiempo de enterramiento. Por otro lado, la lesión del septum medial con tetrodotoxina o la inyección de muscimol, también decrecientan el tiempo de enterramiento (Degroot y Treit, 2004; Degroot y Treit, 2003; Degroot et al., 2001).

**b) *Hipocampo.*** Cuando esta estructura cerebral del lóbulo temporal se lesiona de forma neurotóxica y se mide la conducta en la prueba de enterramiento defensivo condicionado, se observa una disminución del enterramiento en la etapa de retención (Lehmann et al., 2005; Lehmann et al., 2006), pero no en la etapa de adquisición (Treit y Menard, 1997). En el caso de la prueba no condicionada (de un sólo ensayo), la estimulación eléctrica del hipocampo dorsal (Dringenberg et al., 2008) o la inyección de pregnanolona (Bitrân et al., 1999) disminuyen el tiempo de enterramiento.

**c) *Corteza prefrontal.*** En esta región la inyección de midazolam (Shah y Treit, 2004), y la lesión con ácido iboténico de parte medial (Shah y Treit,

2003) disminuyen el tiempo de enterramiento de forma clara y, por lo tanto, los niveles de miedo y ansiedad.

**d) *Hipotálamo, fórnix y núcleo del rafé dorsal.*** Inyecciones de muscimol en el hipotálamo anterior (Hakvoort Schwerdtfeger y Menard, 2008) y la lesión electrolítica del rafé dorsal (Treit et al., 1993b) disminuyeron el tiempo de enterramiento, por otro lado la lesión con tetrodotoxina de la fimbria fórnix incrementó el número de choques recibidos pero no el enterramiento (Degroot y Treit, 2004).

## **2.7. Enterramiento defensivo y amígdala**

Merece una mención aparte la amígdala. Esta estructura se encuentra sumergida en las profundidades del lóbulo temporal y es primordial para el procesamiento del miedo y la ansiedad (LeDoux, 2003; Millan, 2003; Pérez de la Mora et al., 2007a). Se abordará de forma más detallada a la amígdala en el siguiente capítulo. Por lo pronto, en el enterramiento defensivo se han obtenido resultados controversiales. Así, se ha demostrado una disminución del tiempo de enterramiento tras la inyección bilateral de alopregnanolona (Engine y Treit, 2007) y del antagonista de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos 5 (mGluR5) MPEP (Pérez de la Mora et al., 2006), que en otros modelos producen efectos ansiolíticos (Pérez de la Mora et al., 2006; Laconi et al., 2001). Así mismo, cuando este modelo se utilizó en su modalidad condicionada se observó una disminución en el tiempo de enterramiento en ratas con la amígdala lesionada (Roozental et al., 1991), cuando en el segundo ensayo se les presentó el electrodo a las ratas pero sin estar electrificado. Sin embargo, en otros estudios en donde se lesionó la amígdala (Treit y Menard, 1997; Treit et al., 1993a) o se inyectó midazolam en el núcleo central (Pesold y Treit, 1994; Pesold y Treit, 1995), solo se observó un aumento en el número de choques recibidos sin afectar la conducta de enterramiento. De igual forma, la administración intra-amigdalina de la CCK-4 y

CCK-8S, (Pérez de la Mora et al., 2007b) que exhiben efectos ansiogénicos en el laberinto elevado en forma de "+", no tuvieron ningún efecto cuando se usó en la prueba del enterramiento defensivo.

Con base en lo anterior concluimos que el enterramiento defensivo es una prueba válida y confiable para estudiar el miedo y la ansiedad, y que su aplicación en el estudio de la participación de los sistemas de neurotransmisión específicos de la modulación amigdalina en estos fenómenos, constituye una herramienta de gran utilidad.

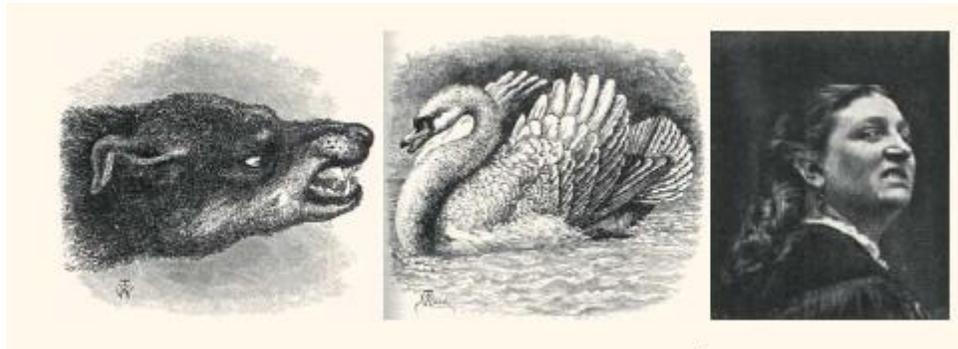
## Capítulo 3

### Sustratos anatómicos y fisiológicos del miedo y la ansiedad

#### 3.1. Antecedentes históricos del estudio científico de las emociones

##### 3.1.1. Darwin y las emociones

En 1873, Charles Darwin (en Dalgleish, 2004) publicó “La expresión de las emociones en el hombre y en los animales”, en donde realizó dos importantes contribuciones al estudio científico de las emociones: la primera, fue la noción que las emociones animales son homólogas a las humanas (figura 2); la segunda fue la propuesta de que existen un conjunto de emociones básicas o fundamentales presentes en todas las culturas y especies. Estas dos ideas influyeron profundamente promoviendo el uso de animales en la investigación para entender la emoción en los humanos (Davidson, 2003; Dalgleish, 2004).



*Tomada de Dalgleish, 2004.*

**Figura 2. Expresiones emocionales análogas.** *En la imagen se muestran dibujos realizados por Darwin y publicados en su libro “La expresión de las emociones en el hombre y en los animales”, revelando las similitudes de las expresiones emocionales en diferentes especies.*

### *3.1.2. Circuito de Papez*

En 1937, James Papez (en Pinel, 2007) propuso su famoso “Circuito de Papez”, una serie de caminos anatómicos que intentaban explicar los mecanismos neurales de la emoción. Según Papez, la información sensorial se dirigía al tálamo y ahí se dividía en dos caminos: el del “pensamiento” y el del “sentimiento”. La vía del “pensamiento” transmitía la información del tálamo a las cortezas sensoriales visuales, auditivas, táctiles, etc., después esta información era transmitida a la corteza cingulada e hipocampo en donde las sensaciones se convertían en percepciones, pensamientos y memorias, luego a través del fórnix llegaban a los cuerpos mamilares del hipotálamo y de nuevo al tálamo anterior vía el tracto mamilotálamico. Por otro lado, la vía de los “sentimientos” transmitía la información sensorial del tálamo directamente a los cuerpos mamilares, permitiendo la generación de emociones y vía el tálamo anterior llegaba a la corteza cingulada. Ahora se sabe que muchas de las vías propuestas por Papez realmente existen, pero no todas están involucradas o son esenciales para la generación de las emociones.

### *3.1.3. Teoría del Sistema límbico*

En 1949, Paul MacLean (en Dalgleish, 2004) propuso la teoría del sistema límbico, que decía que el cerebro se estructura en tres partes:

- La primera parte la llamó el cerebro reptiliano, evolutivamente el más antiguo. Incluía el complejo estriatal y los ganglios basales, atribuyéndoles la generación de emociones como el miedo y la agresión (Dalgleish, 2004).
- La segunda parte la constituyó el cerebro visceral, que procesa respuestas más complejas que el cerebro reptiliano. Incluía la mayoría de los componentes del circuito de Papez, como el tálamo, hipotálamo, hipocampo y corteza cingulada, además de la amígdala y la corteza prefrontal. Éste es el llamado sistema límbico (Dalgleish, 2004).

- Finalmente, la tercera parte es la neocorteza, que conecta emoción y cognición, ejerce control sobre las respuestas producidas por los otros sistemas (Dalglish, 2004).

La idea del sistema límbico ha sobrevivido hasta nuestros días, pero no ha permanecido intacta, pues la investigación ha demostrado que el hipocampo, los cuerpos mamilares y el tálamo parecen tener una participación mayor en diferentes procesos cognoscitivos, por ejemplo la memoria declarativa. Por otro lado, áreas como el estriado ventral, ganglios basales, hipotálamo, corteza cingulada, corteza prefrontal y amígdala, parecen ser fundamentales en el procesamiento emocional (LeDoux, 1996).

#### *3.1.4. Síndrome de Klüver-Bucy*

En 1939, Klüver y Bucy mostraron que la remoción bilateral de los lóbulos temporales en monos producía una serie de conductas anormales que incluían: una pérdida de la reactividad emocional, aumento de la conducta de exploración, tendencia a examinar los objetos con la boca e hipersexualidad. Este descubrimiento resaltó la importancia de los lóbulos temporales en las emociones y a este conjunto de síntomas se le denominó síndrome de Klüver-Bucy (Pérez de la Mora et al., 2007a).

Aunque la amígdala era parte de la teoría del sistema límbico de McLean y el trabajo original de Klüver-Bucy implicó la remoción quirúrgica de ambos lóbulos temporales en los monos, fue hasta 1956 cuando Weiskrantz demostró que la hiperoralidad, pasividad y demás conductas características del síndrome de Klüver-Bucy se producían básicamente por la extirpación o lesión de las amígdalas (LeDoux, 2003). Esta línea de investigación colocó a la amígdala como una de las regiones cerebrales más importantes para el procesamiento de las emociones, particularmente el miedo y la ansiedad.

## **3.2. Importancia de la amígdala en la modulación del miedo y la ansiedad**

### *3.2.1. Descripción estructural de la amígdala*

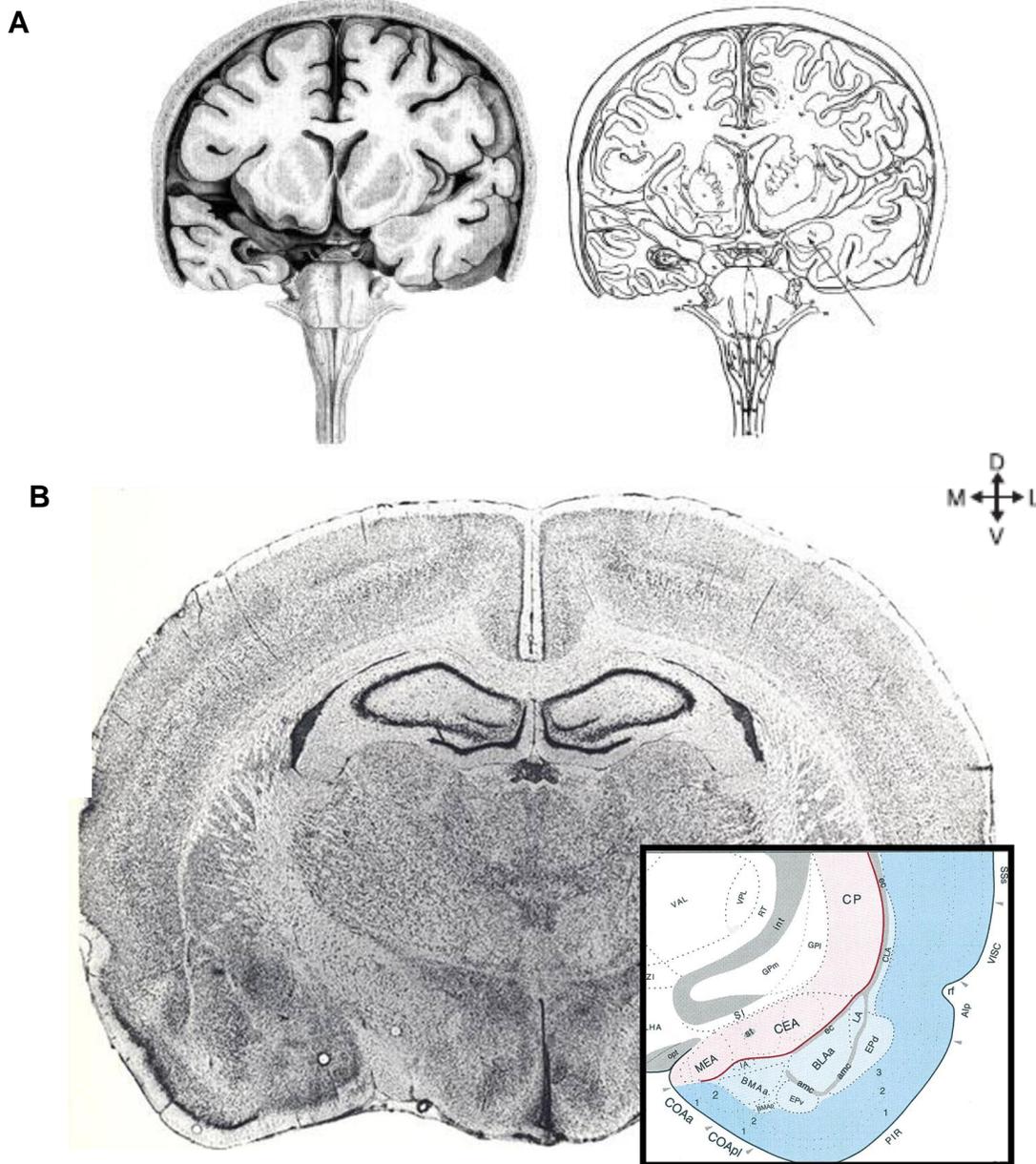
En 1819 el anatomista alemán Karl Friedrich Burdach (en LeDoux, 2000 y en Pérez de la Mora et al., 2007a), identificó una estructura con forma de almendra en la profundidad del lóbulo temporal, que por su semejanza con esta semilla se denominó a esta estructura amígdala (*almendra en latín*). Originalmente la amígdala descrita por Burdach abarcaba lo que hoy conocemos como complejo basolateral (ver figura 3), pero con el paso del tiempo se le han asociado más núcleos que la han transformado en una región compleja y heterogénea. Diversos autores (Swanson y Petrovich, 1998; Pitkänen, 2000; De Olmos et al., 2004) han propuesto divisiones y nomenclaturas con base en su citoarquitectura y funcionalidad. En este trabajo emplearemos la esquematización recopilada en el Atlas de Paxinos y Watson (2004), que a su vez está basada en el texto de De Olmos et al. (2004).

Según De Olmos et al. (2004), se reconocen cuatro divisiones principales en la amígdala de la rata: el grupo nuclear cortical superficial, la amígdala extendida, el complejo nuclear laterobasal y un grupo sin clasificación; divisiones que a su vez se pueden separar en subdivisiones (para mas especificaciones ver la tabla 5).

Aunque la amígdala es un complejo conglomerado, las regiones más relevantes para el miedo y la ansiedad son los núcleos lateral (LA), basal (B), accesorio basal (AB), central (CeA o CE) y las islas paracapsulares (IM, I) (LeDoux 1998, Millan, 2003; Fuxe et al., 2003) (todos estos núcleos se pueden observar en la figura 3). El término complejo basolateral se usa para agrupar a los núcleos basal, lateral y a veces el basal accesorio (LeDoux, 2000).

**Tabla 5.** Clasificación estructural de los núcleos de la amígdala según De Olmos et al., (2004).

División principal	Subdivisiones
<p><b>1) Grupo nuclear cortical superficial</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Amígdala olfatoria</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Núcleo del tracto olfatorio lateral</li> <li>○ Área amigdalina anterior</li> <li>○ Núcleo amigdalino cortical anterior</li> <li>○ Núcleo amigdalino cortical posterolateral</li> <li>○ Área de transición amigdalopiriforme</li> </ul> </li> <li>• <b>Amígdala vomeronasal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Núcleo cama del tracto olfatorio accesorio</li> <li>○ Núcleo amigdalino cortical posteromedial</li> <li>○ Área de transición amigdalohipocampal</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>2) Amígdala extendida</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>División medial de la amígdala extendida</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Núcleo cama de la estría terminal medial</li> <li>○ Núcleo medial de la amígdala</li> <li>○ Núcleo cama de la estría terminal intra-amigdalino</li> <li>○ Amígdala extendida sublenticular medial</li> <li>○ Núcleo cama de la estría terminal supracapsular división medial</li> </ul> </li> <li>• <b>División central de la amígdala extendida</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Núcleo cama de la estría terminal lateral</li> <li>○ Núcleo central de la amígdala</li> <li>○ Amígdala extendida sublenticular central</li> <li>○ Núcleo intersticial del miembro posterior de la comisura anterior</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>3) Complejo nuclear laterobasal</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Núcleo lateral de la amígdala</li> <li>○ Núcleo basolateral de la amígdala</li> <li>○ Núcleo amigdalino ventral basolateral</li> <li>○ Núcleo amigdalino basomedial</li> </ul>
<p><b>4) Grupo sin clasificación.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Islas intercaladas paracapsulares</li> <li>○ Zona de transición amigdaloestrial</li> <li>○ Región gris intramedular amigdalina</li> <li>○ Núcleo cama de la comisura anterior</li> <li>○ Núcleo subventricular</li> </ul>



**Figura 3. Ubicación de la amígdala en cortes coronales de cerebro. En el panel A** del lado izquierdo se muestra un corte coronal de cerebro humano y en el lado derecho la primera ilustración realizada por el anatomista Burdach, con una flecha se indica “el núcleo de la amígdala”, que actualmente corresponde al núcleo basolateral. **En el panel B** se muestra un corte coronal de cerebro de rata teñido con la técnica de Nissl, donde se ubica a la amígdala y sus principales núcleos, del lado izquierdo los núcleos lateral (LA), central (CeA), complejo basolateral (BLA) y medial (MEA), dorsalmente se ubica el caudado-putamen (CP). En la porción derecha se ubica una representación esquemática de los diversos núcleos amigdalinos y estructuras que los rodean. (Imágenes tomadas y modificadas de Swanson y Petrovich, 1998). VAL: complejo ventral anterior lateral del tálamo, VPL : n. ventral posterolateral del tálamo, VM : n. ventral medial del tálamo, ZI: zona incerta, RT: n. reticular del tálamo, Int: cápsula interna, LHA: área hipotalámica lateral, GPm: globus pallidus medial SI: sustancia innominata Opt: tracto óptico, BMA: n. basomedial de la amígdala, EPd: n. endopiriforme, COAa: n. cortical de la amígdala anterior, COAp: n. cortical de la amígdala posterior, PIR: corteza piriforme, Alp: área insular agranular, VISC: área visceral, SS: área somatosensorial, amc: cápsula amigdalina.

### *3.2.2. Participación de la amígdala en el miedo y la ansiedad*

Existe una rara enfermedad autosómica recesiva llamada síndrome de Urbach-Whiette que produce calcificaciones bilaterales en la región medial anterior de los lóbulos temporales, como consecuencia se ve afectada la amígdala en el 50 al 75 % de los casos. Cuando esto ocurre, la conducta de las personas cambia primordialmente en el ámbito afectivo y selectivamente se altera la capacidad para reconocer las expresiones emocionales negativas en rostros de otras personas (Siebert et al., 2003). Análogamente existe, como se indicó antes, el síndrome de Kluver-Bucy, cuyo nombre se aplica a condiciones donde por diversas razones la amígdala es extirpada o dañada, y como consecuencia se observan conductas de hiperoralidad, hipersexualidad, agnosia visual y una tendencia a tocar cualquier estímulo sin discriminación del peligro potencial, esto ha sido observado tanto en humanos (Özdemir y Rezaki, 2007) como en monos (ver apartado 3.1.4).

Con técnicas de neuroimagen se ha observado que la amígdala tiene un funcionamiento alterado en pacientes con desórdenes de ansiedad (Damsa et al., 2009), incluyendo el trastorno de estrés post-traumático (Piefke et al., 2007), el trastorno de pánico (Pfleiderer et al., 2007) y las fobias (Debiec y LeDoux, 2004). También se observa una mayor activación de la amígdala con la resonancia magnética funcional, cuando se da un tipo de condicionamiento al miedo en humanos (Buchel et al., 1998; LaBar et al., 1998).

Estas evidencias apuntan a una participación muy relevante de la amígdala en la modulación del miedo y la ansiedad en humanos, que a su vez se ha visto complementada y apoyada con el estudio más a detalle realizado en modelos animales experimentales.

En monos Rhesus, cuando se lesiona de forma bilateral a las amígdalas, los animales muestran menos conductas de temor frente a una serpiente viva, así como menor congelamiento y menos conductas de sumisión ante un intruso

(Kalin et al., 2001; Kalin et al., 2004). Además se ve alterada la fase inicial de aprendizaje de la prueba de sobresalto potenciado por el miedo (Antoniadis et al., 2007).

De igual forma, en ratas donde se ha lesionado de diversas formas la amígdala (con ácido iboténico, NMDA, tetrodotoxina o electrolítica), ha dado como resultado que las ratas se acercan mayor número de veces a un electrodo electrificado (Lehmann et al., 2003), o disminuye el congelamiento y las vocalizaciones ultrasónicas (Goldstein et al., 1996; Wook Koo et al., 2004).

### *3.2.3. De qué manera modula la amígdala el miedo y la ansiedad*

Para que un organismo reaccione ante una amenaza, sea esta concreta o potencial, es necesario que la información sea procesada y transmitida por diversas estructuras del sistema nervioso. A continuación se describen las fases y regiones cerebrales con mayor importancia en este procesamiento:

1. **Percepción del estímulo.** Primeramente ocurre la detección de un estímulo, la información es transmitida por las vías primarias sensoriales hacia los núcleos sensoriales del tálamo (ver figura 5).
2. **Procesamiento de la información a nivel talámico.** El tálamo es la principal “estación retransmisora” del cerebro, ahí llega toda la información de las vías sensoriales, excepto la del olfato, que tiene vía directa a la amígdala (De Olmos et al., 2004). Entre los núcleos sensoriales talámicos destacan el núcleo geniculado lateral y medial, núcleo talámico posterior, núcleo paratenial, núcleo romboide, núcleo interoanteromedial, núcleo intralaminar posterior (Pitkänen, 2000). El tálamo tiene conexiones con las cortezas sensoriales y con la amígdala. Cuando llega información que puede ser relevante para el sujeto el tálamo tiene dos caminos de envío para esta información, una es

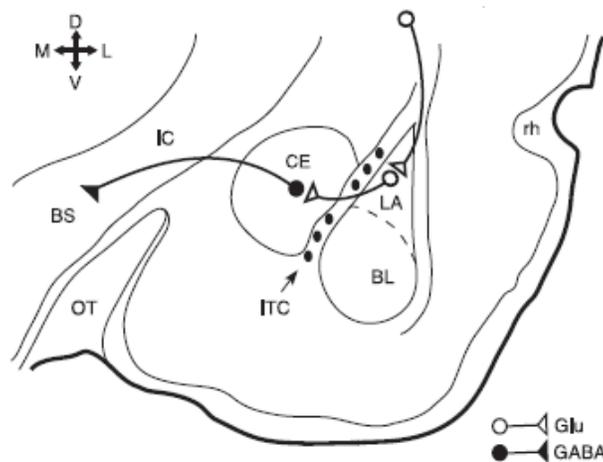
conocida como la “*vía corta*” y otra como la “*vía larga*” (Debiec y LeDoux, 2004). Se conoce como *vía corta aquella por la cual* el tálamo manda la información directamente hacia la amígdala, esta acción genera una representación del estímulo rápida y poco precisa, pero es suficiente para brindarnos un panorama de si el estímulo es amenazante o no. Es decir, nos da una respuesta veloz que aumenta las posibilidades de enfrentar exitosamente el peligro, hecho que en el contexto de la supervivencia biológica es de capital importancia. Adicionalmente, el tálamo manda la misma información hacia las cortezas sensoriales, esta ruta es conocida como *la vía larga*, ya que al alcanzar el nivel cortical el procesamiento de la información es más detallado y la representación es más compleja. Esta información es de igual modo enviada hacia la amígdala para que ocurra una respuesta adecuada ante el estímulo (ver figura 5).

- 3. Procesamiento amigdalino de la información: núcleo basolateral.** La información sensorial proveniente del tálamo y de la corteza llega a los núcleos basolateral y lateral de la amígdala, en donde es muy posible que se “decida” si el sujeto enfrenta en realidad un riesgo que atenta en contra de su integridad o no, pues se contrasta la información relativamente cruda que llega del tálamo con el mismo tipo de información pero ya procesada proveniente de la corteza cerebral. Después de procesar esta información, el complejo basolateral de la amígdala la envía a blancos tales como el hipocampo, la corteza orbitofrontal, el estriado dorsal y ventral y por supuesto el núcleo central de la amígdala y el núcleo cama de la estría terminal (Pérez de la Mora et al., 2007a; Davis y Whalen, 2001). Las eferentes enviadas hacia el hipocampo podrían estar influyendo en la consolidación de memorias emocionales, así como en la modulación del aprendizaje espacial (Biedenkapp y Rudy, 2008). Las fibras hacia la corteza orbitofrontal también participarían en la formación de memorias de eventos emocionales y en la toma de decisiones (Milad y Rauch, 2007). La

información enviada hacia el estriado dorsal y ventral al parecer participaría promoviendo una conducta de aproximación o evitación (Davidson e Irwin, 1999), y el núcleo central se comunicaría con otras regiones para producir las respuestas endocrinas, autonómicas y somáticas necesarias para afrontar la situación amenazante. La manera exacta en la que se comunican el núcleo basolateral y el central no es clara, pero podrían estar involucradas en dicha comunicación las islas intercaladas paracapsulares (Royer et al., 1999) (ver figura 5).

- 4. Islas paracapsulares mediales.** Aunque clásicamente se considera que el flujo de información de la amígdala va del complejo basolateral que concentra información sensorial proveniente del medio ambiente al núcleo central que genera una respuesta ansiosa, estudios recientes han puesto de manifiesto que dicho flujo de información está en realidad controlado por una interfase inhibitoria constituida por la isla intercalada principal y el resto de las islas intercaladas paracapsulares que se interponen entre ambos núcleos (Paré et al., 2004; Pérez de la Mora et al., 2006; Pérez de la Mora et al., 2007a; Pérez de la Mora et al., 2008) (ver figura 5). Adicionalmente, en la parte lateral del núcleo central de la amígdala se encuentran localizadas numerosas neuronas gabaérgicas espinosas de tamaño mediano (Sun y Cassel, 1993) que podrían constituir otra interfase gabaérgica inhibitoria (Sun y Cassel, 1993; Pérez de la Mora et al., 2008), cuya función sería controlar el flujo de información del núcleo central y otras regiones extra-amigdalinas hacia la parte medial del núcleo central y hacia el núcleo cama de la estría terminal, ejerciendo una inhibición tónica sobre las neuronas glutamatérgicas o peptidérgicas eferentes que comunican a estas dos estructuras con centros autónomos localizados en el tallo cerebral y el hipotálamo. Dado el carácter inhibitorio de estas neuronas sobre las neuronas de proyección del núcleo central y del núcleo cama de la estría terminal, la expresión autónoma del miedo y la ansiedad requerirá consecuentemente de su inhibición. Dicha inhibición se lograría por la

mediación de las neuronas gabaérgicas presentes en las mismas islas paracapsulares mediales pero localizadas en una ubicación mas lateral y que al estar polarizadas en dirección latero-medial inhiben a las neuronas de las islas paracapsulares mas medialmente dispuestas, a cuyo cargo corre el control inhibitorio de estas islas sobre las neuronas de proyección del núcleo central y del núcleo cama de la estría terminal (Paré et al., 2003; Paré et al., 2004).



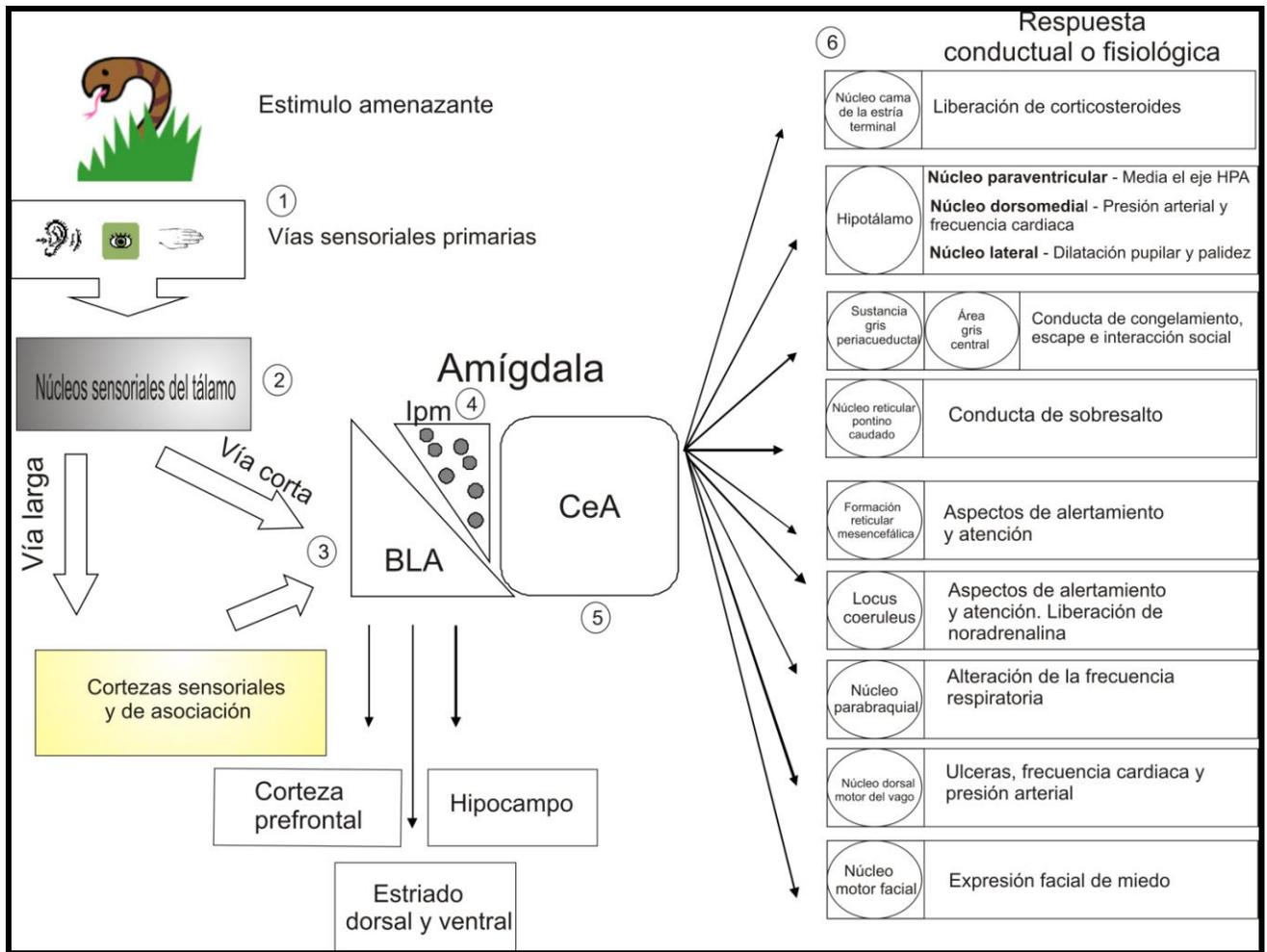
**Figura 4. Localización de las islas paracapsulares mediales (ITC).** Esquema representativo de la amígdala derecha. Se observan los núcleos central (CE), basal lateral (BL) y lateral (LA) formando al complejo basolateral, entre ellos se ubican las ITC, que intercomunican a ambos núcleos. Otras abreviaturas: BS: tallo cerebral, IC: cápsula interna, OT: tracto óptico, rh: surco rinal, Glu: glutamato, GABA: ácido gamma-amino-buítico (Imagen tomada de Paré et al., 2004).

5. **Núcleo central de la amígdala.** Tomada la decisión sobre si el sujeto enfrenta un riesgo real o potencial, correría a cargo de los núcleos centro-mediales de la amígdala y del núcleo cama de la estría terminal, generar una respuesta autónoma y somática acorde a la naturaleza y magnitud de la amenaza que experimenta el sujeto, ya que poseen una amplia conectividad con centros autónomos y somáticos responsables de regular entre otras funciones: la secreción de hormonas hipotalámicas, la respiración, la actividad cardiovascular, la tensión muscular y la intensidad de los reflejos (Pérez de la Mora et al. 2007a).

6. **Eferentes de la amígdala.** A continuación se mencionan las principales regiones estudiadas hacia donde se proyectan fibras eferentes desde la amígdala y se describe la contribución en la producción del miedo y la ansiedad (ver figura 5).

- **Núcleo cama de la estría terminal.** Esta región forma parte de la llamada amígdala extendida y envía eferentes a la casi totalidad de los núcleos inervados por el núcleo central. Estaría modulando la liberación de corticosteroides, además se le ha relacionado con la conducta de congelamiento (Van de Kar y Blair, 1999; Davis y Whalen, 2001; Sullivan et al. 2004; Forray et al. 2004).
- **Hipotálamo.** El núcleo paraventricular hipotalámico es la región principal que media la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal conocido como el “eje del estrés”, cuya activación resulta en la liberación de corticosteroides en el plasma sanguíneo (DiMicco et al. 2002) y además estaría mediando la taquicardia (Kawabe et al. 2009); el hipotálamo dorsomedial mediaría los cambios en la presión arterial y la frecuencia cardíaca (DiMicco et al., 1996; Dampney et al. 2008) y el hipotálamo lateral la dilatación pupilar y la palidez (Davis y Whalen, 2001).
- **Sustancia gris periacueductal y el área gris central.** Estas áreas median la respuesta de congelamiento y la conducta observada en la prueba de interacción social (Davis y Whalen, 2001; Vianna y Brandao, 2003; File y Seth, 2003).
- **Núcleo reticular-pontino-caudado.** Interviene en el reflejo de sobresalto acústico y participa en la potenciación del sobresalto potenciado por el miedo (Fendt. et al., 1996, Birnbaum y Davis, 1998; Davis y Whalen, 2001).
- **Formación reticular mesencefálica.** Modula el control de aspectos atencionales y de alertamiento (Cardinal et al., 2002).

- **Área tegmental ventral.** Libera dopamina en la vía mesolímbica, incluyendo la amígdala (Carvalho et al., 2005). Produce un aumento de metabolitos dopaminérgicos en la corteza prefrontal medial (Goldstein et al., 1996).
- **Locus coeruleus.** Modula los procesos de atención, vigilancia y alertamiento (Davis y Whalen, 2001; Steimer, 2002).
- **Núcleo motor dorsal del nervio vago y núcleo del tracto solitario.** Están involucrados con la modulación de la frecuencia cardíaca y la presión arterial (Saha, 2005; Davis y Whalen, 2001).
- **Núcleo parabraquial del tallo cerebral.** Participa en el aumento o disminución de la frecuencia respiratoria (Gallego et al. 2001; Davis y Whalen, 2001).
- **Núcleo motor facial y trigémino.** Participa en la expresión facial de miedo (Davis y Whalen, 2001).



**Figura 5. Esquema del procesamiento neurobiológico del miedo y la ansiedad.** El proceso inicia con la percepción del estímulo amenazante (1) y su transmisión de las vías sensoriales primarias al tálamo (2), después se pueden seguir una vía corta que va directamente a la amígdala o una vía larga en donde se retransmite primero a la corteza y después a la amígdala (3). Una vez en la amígdala, el complejo basolateral (BLA) evalúa la información y la transmite a través de las islas paracapsulares mediales (Ipm) (4) hacia el núcleo central (CeA), en donde se generará la respuesta adecuada estimulando los núcleos necesarios para una respuesta autónoma, endocrina y conductual de miedo y ansiedad (6). El BLA también transmite la información al hipocampo y a la corteza para la formación y consolidación de la memoria emocional y al estriado ventral para motivar la respuesta motora (Basado en Davis y Whalen, 2001; Steimer, 2002).

### *3.2.4. Bases biológicas del miedo condicionado*

Una gran parte del trabajo de investigación realizado en el campo de las respuestas de miedo y ansiedad son los estudios que utilizan el procedimiento conocido como miedo condicionado. Mientras que la respuesta ante ciertos estímulos es innata, el miedo condicionado requiere que se presenten de forma contingente un estímulo incondicionado (ej. sonido estridente) y un estímulo condicionado (ej. luz). El estímulo incondicionado producirá naturalmente un sobresalto en el animal. Después de presentaciones constantes de estos dos estímulos juntos, se logra que el estímulo condicionado adquiera las propiedades del estímulo incondicionado, por lo que a la vista de la luz se presentará el sobresalto (Maren, 2001; Debiec y LeDoux, 2004). Para ampliar la información sobre los modelos animales condicionados ver apartado 1.5.3.

A diferencia de las pruebas no condicionadas que generan respuestas innatas ante objetos o situaciones aversivas, el miedo condicionado estaría estudiando la formación de memorias de miedo generadas por la presencia de un estímulo inicialmente inocuo que se ha apareado con un estímulo aversivo. Estudios de varios laboratorios han llevado a la conclusión de que cuando se daña la amígdala se interfiere con la adquisición y expresión del miedo condicionado (LeDoux, 2000; Maren, 2001; LeDoux, 2003). La formación de memorias de miedo, se explica principalmente por la aparición del fenómeno conocido como potenciación a largo plazo que se da en otras regiones del núcleo basolateral de la amígdala (LeDoux, 2000).

Se considera que la formación de memorias se da gracias a los cambios plásticos que ocurren en las sinapsis de las neuronas. Dichos cambios se observaron inicialmente en algunas zonas del hipocampo relacionadas con la memoria y el aprendizaje, en donde las neuronas son capaces de modificar la eficiencia sináptica en base al incremento de la actividad de una vía nerviosa determinada que actúa sobre neuronas que poseen un tipo especial de receptores de membrana.

Ante un estímulo excitatorio continuo las neuronas que poseen receptores glutamatérgicos que reconocen al N-metil-D-aspartato (NMDA) se hacen más sensibles a los estímulos recibidos, generando cascadas metabólicas que eventualmente llevan a un aumento de la síntesis de proteínas y que aumentan la amplitud de la respuesta y la duración del evento sináptico (Blundon y Zakharenko, 2008). El glutamato se une a receptores tipo AMPA (que reconocen al ácido alfa-amino 3-hidroxy-5-metil-4-isoxasol-propionico) y despolariza la célula postsináptica. Esta despolarización remueve el magnesio que bloquea a los receptores NMDA, haciendo que el calcio fluya hacia el interior de la célula a través del canal que se forma entre sus subunidades. Así mismo, la despolarización inicial contribuirá por si misma al paso de calcio hacia el interior de la célula abriendo canales de calcio dependientes de voltaje (Bauer et al., 2002). Bajo estas condiciones, el incremento en el calcio intracelular activará diversos péptidos como la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina II (CaMKII) y otras proteínas cinasas (PKA, PKC). El resultado final, será la fosforilación de un buen número de proteínas específicas, algunas de las cuales se trasladan al núcleo en donde estimulan la actividad de varios factores de transcripción, entre ellos el elemento de respuesta a la unión del AMP cíclico (CREB). De este modo son activados determinados genes, los cuales codifican la síntesis de proteínas específicas (LeDoux, 2003).

Dado que en el complejo basolateral se reúne la información generada por la aplicación de los estímulos condicionados y no condicionados, y además se ha demostrado que los procesos moleculares anteriormente descritos para el hipocampo también ocurren en la amígdala durante el miedo condicionado (Bauer et al., 2002; Blair et al., 2001; Schafe et al., 2001). Se ha supuesto que la amígdala podría ser el sustrato fisiológico de la formación y almacenamiento de las memorias emocionales (LeDoux, 2000; Fendt, 2001; Jasnow et al., 2004).

### 3.2.5. *La amígdala y sus neurotransmisores*

Dada la complejidad anatómica de la amígdala, no es sorprendente que dentro de ella se hayan encontrado a prácticamente todos los neurotransmisores descritos. Aunque los efectos de un determinado neurotransmisor dependen en última instancia de las características particulares del circuito en el que se encuentra la sinapsis para dicho neurotransmisor en la amígdala. Globalmente es posible identificar neurotransmisores con acciones preferentemente ansiolíticas y ansiogénicas (Pérez de la Mora et al., 2007a). Sin embargo, los principales sistemas de neurotransmisión en la amígdala son el gabaérgico y el glutamatérgico.

- **Sistema gabaérgico.** Dentro de los neurotransmisores descritos destacan por su abundancia e importancia en la modulación de la ansiedad, el ácido gamma amino butírico (GABA) y el glutamato. Estudios que utilizaron anticuerpos en contra del GABA, demostraron la existencia de cuerpos celulares gabaérgicos en todos los núcleos de la amígdala y la mayor densidad de ellos en las islas intercaladas paracapsulares y en la porción lateral del núcleo central (Paré y Smith, 1993). Adicionalmente, se han encontrado tanto receptores GABA<sub>A</sub> como GABA<sub>B</sub>, pero al parecer son los receptores GABA<sub>A</sub> los que parecen mediar los efectos de la transmisión gabaérgica en el miedo y la ansiedad, pues la micro-inyección de muscimol en el núcleo basolateral de la amígdala, un agonista gabaérgico tipo A, facilita la extinción del miedo condicionado (Akirav et al., 2006; Van Nobelen y Kokkinidis, 2006) y bloquea su adquisición y expresión (Jasnow y Huhman, 2001). En vista de lo anterior y debido a que los efectos de las benzodiazepinas parecen estar mediadas por receptores GABA<sub>A</sub> localizados en la amígdala, se le ha atribuido al GABA un papel ansiolítico.
- **Sistema glutamatérgico.** El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en las vías aferentes sensoriales hacia la amígdala, resultando

particularmente interesante su densa distribución en los núcleos basolateral y central, pues dichos núcleos constituyen respectivamente, las principales estaciones de entrada y salida de información de esta estructura (Farb et al., 1995; Pérez de la Mora et al., 2007a). Del núcleo basolateral llevan información sistemas de proyección glutamatérgicos a la corteza prefrontal, al tálamo y al área tegmental ventral, así como del núcleo central a centros autónomos. Por otro lado, mediante estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado que la mayor parte de los cuerpos celulares presentes en la amígdala expresan inmunorreactividad para las subunidades Glu-R1 y Glu-R2 del receptor glutamatérgico AMPA (MacDonald, 1994; Humeau et al., 2007), pero también se han encontrado receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA (Walker y Davis, 2002) y del kainato (Braga et al. 2004). En su conjunto, dichos receptores podrían estar regulando el fenómeno de potenciación a largo plazo en la amígdala, que a su vez está relacionado con el proceso de aprendizaje y extinción del miedo condicionado (Cortese y Phan, 2006). Por tales razones, en la amígdala se le atribuye al glutamato un efecto preferentemente ansiogénico.

Al considerar las características de la distribución anatómica de los sistemas descritos, es posible sugerir, que el papel de la amígdala en la ansiedad depende de un equilibrio funcional entre los sistemas gabaérgicos ansiolíticos y los glutamatérgicos ansiogénicos, pues aparte de sus propiedades sinápticas inhibitoras y excitadoras respectivamente, son los sistemas de neurotransmisión más difundidos y con mayor número de sinapsis en la amígdala (Pérez de la Mora et al., 2007a).

Sin embargo, en la amígdala también están presentes otros sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico (Steimer, 2002), noradrenérgico (Tanaka et al., 2000), colinérgico (Boccia et al., 2009), dopaminérgico (Greba et al., 2001) e incluso neuropéptidos como la colecistoquinina (Pérez de la Mora et al., 2007b) y el neuropéptido Y (Gutman et al., 2008) entre muchos otros. En la

tabla 6 se presentan algunos sistemas de neurotransmisión estudiados en la amígdala y sus efectos globales relacionados con el miedo y la ansiedad.

Queda claro que para entender el funcionamiento de la amígdala es necesario estudiar las complejas interacciones entre los diferentes sistemas inhibitorios y excitatorios, así como la participación de numerosos tipos de receptores que ejercen sus efectos modulando las transmisiones gabaérgicas y glutamatérgicas. Pero sólo centrándose en uno a la vez, se podrá empezar a clarificar el panorama.

**Tabla 6.** Principales neurotransmisores presentes en la amígdala y sus efectos en los fenómenos de miedo y ansiedad.

Neurotransmisor	Efecto global	Referencia
<b>GABA</b>	Ansiolítico	Martijena et al., 2002
<b>Glutamato</b>	Ansiogénico	Cortese y Phan, 2005
<b>Dopamina</b>	No determinado	Greba et al., 2001; Guarraci et al., 2000
<b>Noradrenalina</b>	Ansiogénico	Tanaka et al., 2000
<b>Serotonina</b>	Ansiogénico	Charney, 2003
<b>Colecistoquinina (CCK)</b>	Ansiogénico	Pérez de la Mora et al., 2007b
<b>Péptido intestinal vasoactivo (VIP)</b>	No determinado	Shin, 2005
<b>Neuropéptido Y (NPY)</b>	Ansiolítico	Gutman et al., 2008
<b>Opioides</b>	Ansiolítico	Verdejo-García et al., 2007
<b>Sustancia P</b>	Ansiogénico	Ebner et al., 2008

(Adaptada de Pérez de la Mora, 2003)

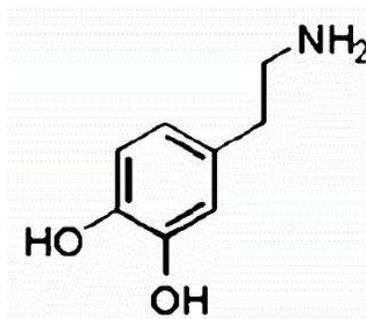
## Capítulo 4

### El sistema de neurotransmisión dopaminérgico: Modulador potencial del miedo y la ansiedad

#### 4.1. Bases anatómicas y fisiológicas del sistema dopaminérgico

##### 4.1.1. Dopamina

La dopamina es una sustancia química que cumple funciones de neurotransmisor en el sistema nervioso central. Al igual que otras monoaminas tiene en su estructura química un grupo catecol y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) en su cadena lateral. Esta amina biogénica, junto con la adrenalina y la noradrenalina, pertenecen al grupo de sustancias procedentes del aminoácido fenilalanina, llamadas catecolaminas. Se ha localizado la presencia de importantes cantidades de catecolaminas en el sistema nervioso central, en el sistema nervioso periférico y en la médula adrenal; pero cabe resaltar que la dopamina es la catecolamina más abundante en el cerebro, pues se estima la presencia de alrededor de 15,000 a 20,000 células dopaminérgicas en el mesencéfalo, contra 5,000 neuronas noradrenérgicas presentes en el tallo cerebral de rata (Weiner y Molinoff, 1994; Cooper et al., 2003; Meyer y Quenzer, 2005).



**Figura 6. Estructura química del neurotransmisor dopamina.** Se puede observar como el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) se localiza en una cadena etil-amina que está unida a un grupo catecol constituido por un anillo bencénico con dos hidroxilos (-OH) vecinos, que le dan el nombre de catecolamina (imagen tomada de Cooper et al., 2003).

#### 4.1.2. Vías del sistema dopaminérgico

A principios de los años 60's los investigadores suecos Annica Dahlström y Kjell Fuxe (1964), describieron por primera vez la existencia y localización de neuronas catecolaminérgicas en el cerebro de la rata y propusieron una nomenclatura para identificar a los grupos neuronales que las contenían. Designaron del A1 al A7 a los grupos noradrenérgicos, mientras que del A8 al A16 a los grupos de neuronas dopaminérgicas. Esta nomenclatura permanece vigente, pero se ha complementado con una descripción estructural de las vías neuronales que utilizan a la dopamina (Anden et al., 1964; Fuxe et al., 1970; Ungerstedt, 1971; Cooper et al., 2003; Meyer y Quenzer, 2005, Pérez de la Mora et al., 2009).

Actualmente, la anatomía de los sistemas dopaminérgicos también es considerada en términos de la longitud de las fibras dopaminérgicas eferentes, dividiéndose según Cooper et al. (2003) en:

**a) Sistemas ultracortos.** Sus neuronas realizan conexiones muy específicas y localizadas. Entre ellas se encuentran grupos de neuronas amacrinas interplexiformes, localizadas entre las capas interna y externa de la retina, así como las células dopaminérgicas periglomerulares del bulbo olfatorio.

**b) Sistemas de longitud intermedia.** Los sistemas de longitud intermedia incluyen:

- i. Sistema túberoinfundibular.* Proyecta desde el núcleo arqueado (A12) hacia la eminencia media. Su papel funcional es controlar la secreción de prolactina.
- ii. Neuronas incerto-hipotalámicas.* Conectan el hipotálamo dorsal y posterior (A13) con el hipotálamo dorsal anterior y el núcleo septal lateral.

iii. *Grupo medular periventricular.* Abarca las células dopaminérgicas presentes en el perímetro del núcleo motor dorsal del nervio vago, el núcleo del tracto solitario y la región tegmental de la materia gris periacueductal.

**c) Sistemas de gran longitud.** Son proyecciones de gran extensión que provienen de los núcleos del área tegmental ventral y de la sustancia nigra, abarcando 3 sistemas:

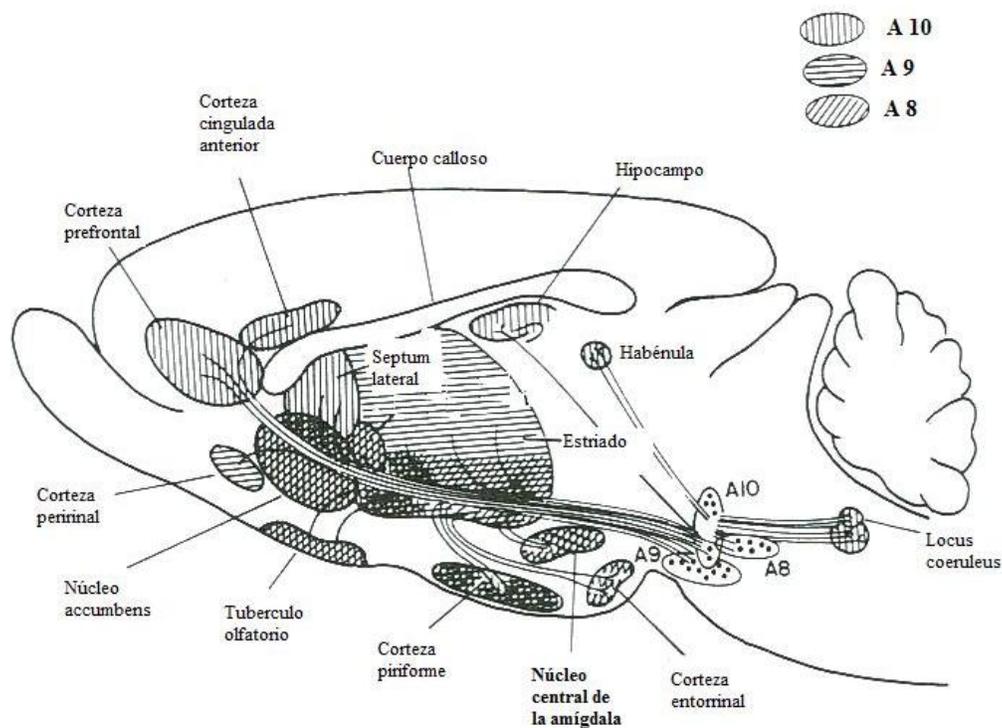
i. *Vía nigro-estriatal.* Las neuronas del área A9 o sustancia nigra proyectan hacia las diversas regiones del estriado dorsal y ventral (caudado-putamen). La vía nigro-estriatal constituye el 80% del sistema dopaminérgico cerebral y está involucrada en el control del movimiento (Jucaite, 2002; Iversen y Iversen, 2006). En el estriado la dopamina liberada tiene una vida media de 74 ms, que permite que se difunda a una distancia de 12  $\mu\text{m}$  (Yao et al., 2008).

Inicialmente se ha dicho que las fibras dopaminérgicas que van del grupo A10 también denominada área tegmental ventral (ATV) hacia la corteza y al sistema límbico constituyen el sistema mesotelencefálico dopaminérgico (Roth y Elsworth, 1995), pero en realidad se pueden distinguir dos vías separadas:

ii. *Vía dopaminérgica mesocortical.* Del ATV se dirigen fibras dopaminérgicas a las cortezas prefrontal, del cíngulo y entorrinal. De este modo la dopamina puede modular funciones cognoscitivas corticales.

iii. *Vía dopaminérgica mesolímbica.* Proyecta al septum, tubérculo olfatorio, hipocampo, núcleo accumbens, núcleos de la estría terminal, amígdala y corteza piriforme (Kandel et al., 2000; Jucaite, 2002; Iversen y Iversen, 2006). La proyección dopaminérgica meso-

amigdalina que incluye la vía mesolímbica, es de vital importancia para el estudio de los estados emocionales. Las fibras dopaminérgicas proyectan del ATV y la sustancia nigra hacia la amígdala (Fallon y Loughlin, 1995) y se ha observado que la concentración de dopamina en el núcleo central de la amígdala es muy alta comparada con la de los otros núcleos amigdalinos (Kilts y Anderson, 1988; Gardner y Ashby, 2000). Asan (1997) de acuerdo con lo anterior, demostró la existencia de una gran densidad sináptica en la parte central lateral del núcleo central y en las islas intercaladas paracapsulares que podrían estar modulando la comunicaciones intra-amigdalina entre los núcleos central y basal de esta estructura.

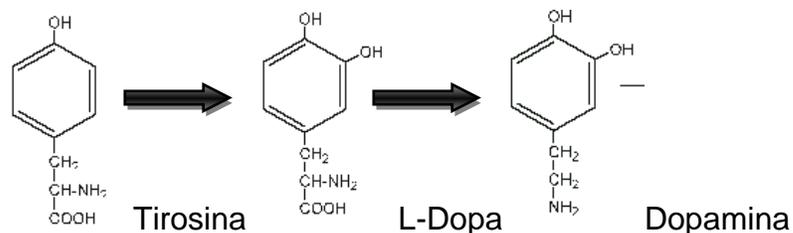


**Figura 7. Localización de las vías dopaminérgica en el cerebro de rata.** *En un corte sagital de cerebro de rata se observan los grupos de neuronas dopaminérgicas A8 (líneas diagonales), A9 (líneas horizontales) y A10 (líneas verticales), y las fibras que inervan distintos núcleos como la habénula, el estriado, la corteza piriforme, la amígdala, principalmente su núcleo central, el núcleo accumbens, la corteza peririnal y entorrinal, la corteza prefrontal y cingulada anterior (tomado de Cooper et al., 1996).*

### 4.1.3. Sinapsis dopaminérgica

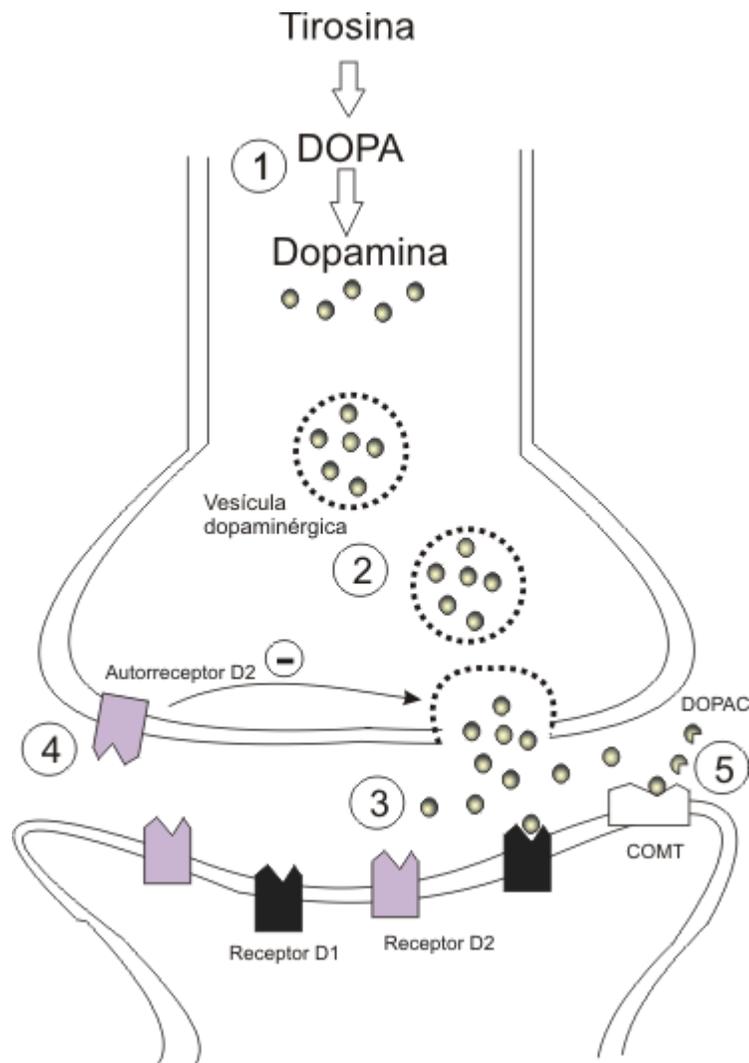
La sinapsis es el proceso esencial a través del cual ocurre la comunicación entre dos neuronas. En el caso de la sinapsis química el mensaje se transmite por medio de un neurotransmisor, por ejemplo la dopamina. A continuación se describen los fenómenos más relevantes que ocurren en la sinapsis dopaminérgica.

1. **Síntesis de dopamina.** La dopamina se sintetiza a través de una vía biosintética que inicia con el aminoácido fenilalanina. Como otros aminoácidos esenciales la fenilalanina se obtiene de las proteínas consumidas en la alimentación y es transportada al cerebro por el flujo sanguíneo (Kandel et al., 2000). La vía se inicia cuando la fenilalanina es convertida en L-tirosina por la enzima fenilalanina hidroxilasa; posteriormente la L-tirosina es transformada en L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) por la acción de la enzima tirosina-hidroxilasa; después la L-DOPA es modificada por la L-aminoácido-aromático-descarboxilasa o DOPA-descarboxilasa para dar lugar a la dopamina (Kandel et al., 2000; Siegel et al., 1994). En el caso de las neuronas dopaminérgicas la vía termina cuando se sintetiza la dopamina y se almacena en vesículas, pero cuando las neuronas son de naturaleza noradrenérgica, la dopamina es transformada en noradrenalina a través de la enzima dopamina-beta-hidroxilasa, la cual a su vez pasa a adrenalina por la acción de la enzima fenil-etanolamina-N-metil transferasa (Kandel et al., 2000; Cooper et al., 2003).



**Figura 8. Vía biosintética de la dopamina.** Una vez que el aminoácido fenilalanina es convertido en tirosina, a través de la enzima DOPA-descarboxilasa se convierte en L-DOPA y este a su vez da lugar al neurotransmisor dopamina.

2. **Liberación de dopamina.** Una vez que la dopamina es sintetizada en la neurona presináptica, es encapsulada dentro de las vesículas. Cuando ocurre un potencial de acción, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se abren y permiten el paso de este ion hacia el interior de la terminal nerviosa. El incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promueve la fusión de las vesículas con la membrana neuronal y se produce la exocitosis del neurotransmisor, liberándolo hacia el espacio sináptico (Siegel et al., 1994).
  
3. **Unión del ligando y receptor.** Cuando la dopamina es liberada hacia la neurona postsináptica, ésta interactúa con receptores específicos que desencadenan respuestas diversas según se trate de la subfamilia  $\text{D}_1$  o  $\text{D}_2$  cuyas características se abordarán en el siguiente apartado.
  
4. **Receptores presinápticos o autorreceptores.** Estos receptores se encuentran en la neurona pre-sináptica y modulan la síntesis y la liberación de dopamina de la terminal nerviosa. Funcionan mediante un mecanismo de retroalimentación negativo, ya que cuando hay mucha dopamina en el espacio sináptico decremantan su liberación.
  
5. **Inactivación de la acción del neurotransmisor.** Una vez que la dopamina ha transmitido su mensaje se inactiva. Su inactivación puede darse a través de dos procesos: uno es su recaptura hacia la terminal presináptica mediante un transportador de dopamina presente en la membrana presináptica; otro es su inactivación química (metabolismo) llevada a cabo por las enzimas catecol-O-metiltransferasa (COMT) y por la monoamino-oxidasa (MAO). En el caso de la dopamina, la MAO la degrada en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) que a su vez se puede metabolizar a ácido homovanílico (HVA) por la acción de la COMT.



**Figura 9. Esquema de una sinapsis dopaminérgica.** La sinapsis inicia con la síntesis de dopamina del aminoácido tirosina hasta convertirse en dopamina (1), después se almacena en vesículas sinápticas y cuando se fusiona con la membrana celular es liberada al espacio sináptico (2), posteriormente se une con los receptores dopaminérgicos, ya sean  $D_1$  o  $D_2$ , y se desencadena la cascada enzimática correspondiente (3), además la presencia de autorreceptores en la neurona presináptica detecta la cantidad de dopamina presente y puede disminuir su liberación (4), por último la dopamina es degradada por las enzimas COMT y MAO (5) (basado en Cooper et al., 2003).

## 4.2. Receptores dopaminérgicos

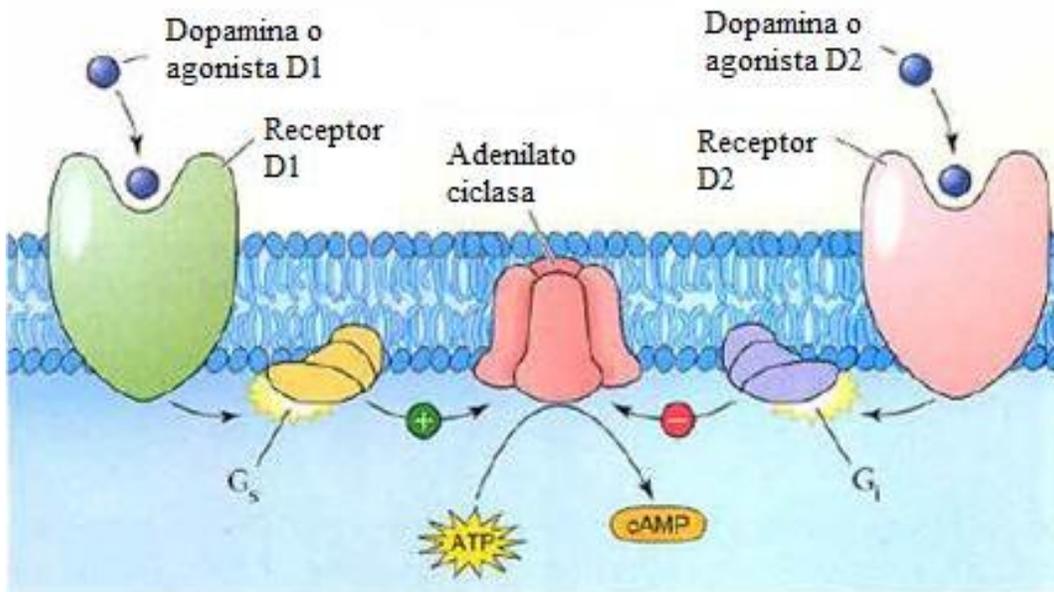
### 4.2.1. Generalidades sobre los receptores ionotrópicos y metabotrópicos

Los receptores son proteínas presentes en la membrana de la neurona que tienen como función reconocer la estructura de una sustancia específica y desencadenar una acción molecular concreta. Los receptores pueden ser *ionotrópicos* cuando están asociados a canales iónicos y *metabotrópicos* cuando los receptores están acoplados a una proteína G. Los receptores ionotrópicos permiten el paso de iones dentro y fuera de la neurona en menos de una milésima de segundo, estas son conocidas como sinapsis rápidas. Por otro lado, los receptores metabotrópicos tienen efectos muy complejos que ocurren en un periodo de 10 milisegundos y varios segundos, por lo que reciben el nombre de sinapsis lentas (Flórez, 1997; Greengard, 2001; Pinel, 2007).

Los receptores dopaminérgicos son receptores metabotrópicos constituidos por siete dominios transmembranales que están acoplados a proteínas G constituidas por tres diferentes subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Tras la activación del receptor por la dopamina, las proteínas G con las que este interactúa se disocian para producir una subunidad  $\alpha$ , cuya naturaleza y propiedades dependen de la proteína G en cuestión y un dímero  $\beta\gamma$ . Las subunidades  $\alpha$  así producidas interactúan con la enzima membranal denominada adenil-ciclase activándola (subunidades  $\alpha_s$ ) o inhibiéndola (subunidades  $\alpha_i$ ) y aumentando o disminuyendo la formación del AMP cíclico. El AMP cíclico formado que constituye un segundo mensajero merced a sus efectos estimulatorios sobre la enzima proteína quinasa A regulan la función de un gran número de proteínas, incluyendo canales iónicos y a los propios receptores para los neurotransmisores (Flórez, 1997; Kandel et al., 2000; Guyton y Hall, 2001; Arias-Montaña y García-Hernández, 2001).

#### 4.2.2. Familia de receptores dopaminérgicos

Experimentos de clonación han indicado la existencia de cinco genes que codifican para cinco subreceptores dopaminérgicos. Dada la gran homología que estos genes tienen en su secuencia de bases, los receptores codificados sólo difieren en pequeñas modificaciones que ocurren en su secuencia de aminoácidos, característica que les confiere diferente afinidad por el neurotransmisor y un diferente acoplamiento con sus sistemas de transducción. Los receptores dopaminérgicos se agrupan en dos subfamilias principales según su perfil farmacológico: si el receptor está acoplado a una proteína G estimulante de la adenilato ciclasa se considera un miembro de la subfamilia  $D_1$ , si está acoplado en cambio a una proteína G inhibidora pertenece a la subfamilia  $D_2$  (Kandel et al., 2000; Greengard, 2000; Pinel, 2007).



**Figura 10. Familia de receptores dopaminérgicos.** Los receptores dopaminérgicos se dividen en dos familias, los tipo  $D_1$  y los tipo  $D_2$ . Los receptores tipo  $D_1$  estimulan a la proteína de membrana adenilato ciclasa, que a su vez estimula la producción de AMP cíclico funcionando como segundo mensajero. Por otro lado, los receptores tipo  $D_2$  inhiben a la adenilato ciclasa y la síntesis de AMPc (imagen tomada de Meyer y Quenzer, 2005).

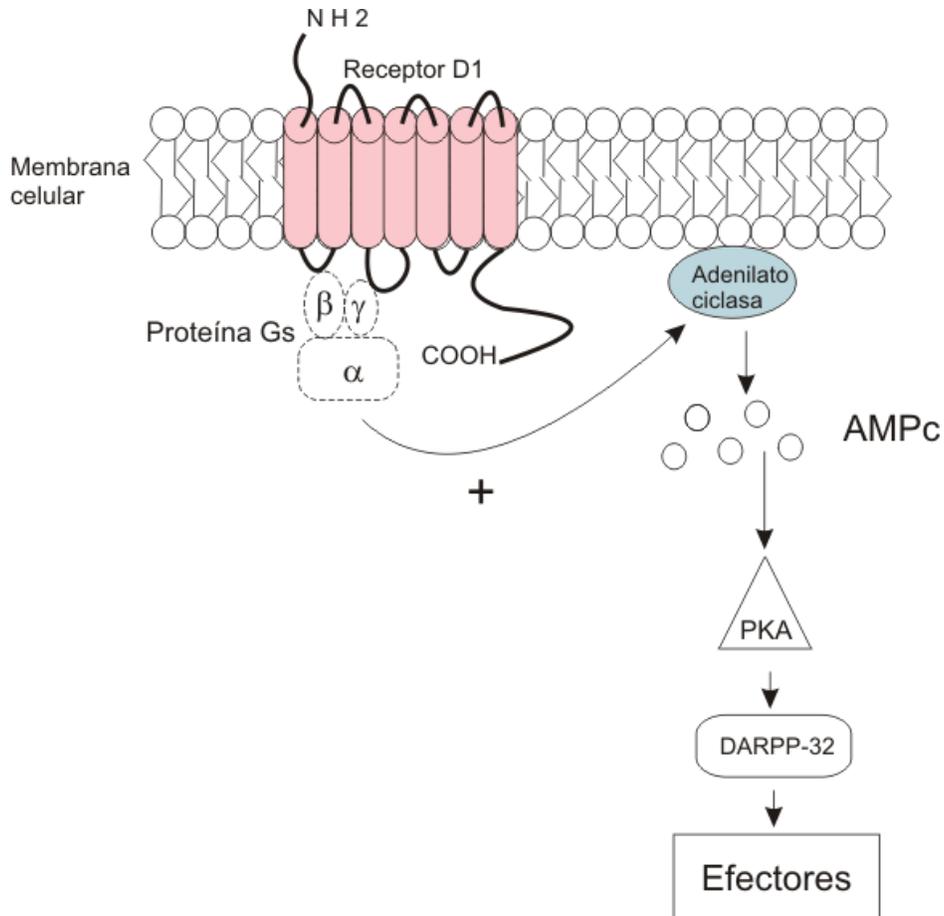
### **4.2.3. Receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub>**

#### *4.2.3.1. Estructura de los receptores D<sub>1</sub>*

Los receptores dopaminérgicos pertenecientes a la subfamilia D<sub>1</sub> son proteínas integrales de membrana que muestran siete dominios transmembranales y poseen un residuo amino terminal extracelular y un carboxilo terminal intracelular. Dentro de esta familia se encuentran los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>.

#### *4.2.3.2. Sistemas de transducción*

Los receptores D<sub>1</sub> como ocurre con los D<sub>2</sub> están asociados a proteínas G. En el estriado, cuando la dopamina se une al receptor D<sub>1</sub>, la proteína G<sub>s</sub> estimula a la enzima membranal denominada adenilato ciclasa que cataliza la conversión de una pequeña cantidad de trifosfato de adenosina (ATP) del citoplasma en adenosin monofosfato cíclico (AMPc), que a su vez activa a la proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA). Dicha cinasa fosforila una proteína específica conocida como la DARPP-32 (dopamine and cAMP regulated phosphoprotein) e inhibe a la proteína fosfatasa 1 (Greengard, 2001). En la amígdala los receptores D<sub>1</sub> están en cambio acoplados, vía la proteína G<sub>q</sub> a la fosfolipasa C (Undie y Friedman, 1990) que produce como segundos mensajeros al diacilglicerol que activa a la proteína cinasa C y al inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), que a su vez promueve la liberación de calcio del retículo endoplásmico. La importancia de estos mecanismos de transducción reside en que tan sólo unas pocas moléculas de la adenilato ciclasa o de la fosfolipasa C bastarán para activar muchas más moléculas de la siguiente enzima, que a su vez activa otra enzima y así sucesivamente, desencadenando una acción potente y amplificada (Guyton y Hall, 2001).



**Figura 11. Acción de los receptores tipo D<sub>1</sub>.** En la imagen se muestra al receptor D<sub>1</sub>-like embebido en la membrana celular y se observa la cascada de señalización de proteínas y enzimas que se llevan a cabo cuando la dopamina se une en el estriado a estos receptores. El receptor D<sub>1</sub> se encuentra unido a una proteína G excitadora de la adenilato ciclasa que aumenta la producción del AMPcíclico y se produce la fosforilación de la proteína PKA, que fosforila a la DARPP-32 y activa a los efectores (basado en Cooper et al., 2003).

Los receptores tipo D<sub>1</sub> tienen poca afinidad para la mayoría de los antipsicóticos y cabe destacar que el receptor D<sub>5</sub> tiene una afinidad 10 veces mayor para la dopamina comparada con su similar D<sub>1</sub> (Cooper et al., 2003; Kandel et al., 2000).

#### 4.2.3.3. Localización de los receptores D<sub>1</sub>

Se ha encontrado una alta concentración de ácido ribonucleico mensajero (RNAm por sus siglas en inglés) para receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> en diversas

regiones cerebrales tales como: la corteza endopiriforme, caudado-putamen, núcleo accumbens, bulbo olfatorio, giro dentado, núcleos del tálamo, capa granular del cerebelo, hipocampo ventral, sustancia nigra pars reticulata, locus coeruleus, rafé dorsal, núcleo supraquiasmático y aunque en menor densidad en la amígdala (Mansour y Watson, 1995; Maltais et al., 2000). Por otro lado, se ha confirmado mediante técnicas autorradiográficas la presencia de sitios de unión para diversos ligandos dopaminérgicos  $D_1$  en la sustancia nigra pars reticulata, globo pálido, bulbo olfatorio y en amígdala en densidades comparables (Levey et al., 1993).

A diferencia de los receptores  $D_1$ , se conoce muy poco de la distribución de los receptores  $D_5$ , aunque recientemente se ha utilizado un anticuerpo específico que detectó la presencia de estos receptores en neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, sustancia nigra pars compacta, hipotálamo, estriado, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio (Khan et al., 2000).

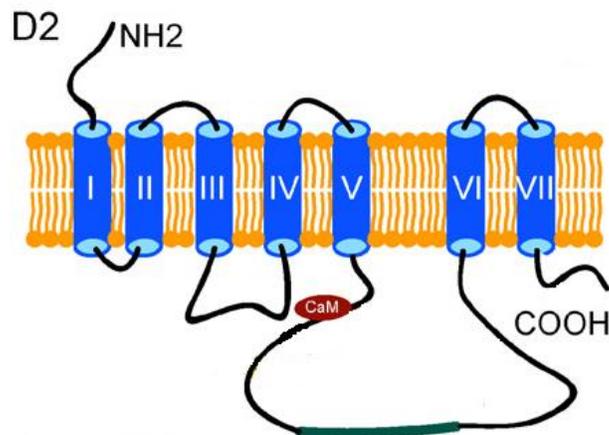
#### *4.2.3.4. Distribución de receptores $D_1$ en la amígdala*

En la amígdala se ha localizado una gran densidad de RNAm para receptores  $D_1$  en la isla intercalada principal (Scibilia et al., 1992; Maltais et al., 2000; Mansour y Watson, 1995), islas intercaladas paracapsulares (Scibilia et al. 1992), núcleo basolateral, núcleo medial, núcleo central y núcleo cortical (Mansour y Watson, 1995). De acuerdo con estos resultados, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha confirmado la presencia de este receptor en el núcleo intercalado de la amígdala, el núcleo basolateral y las islas intercaladas paracapsulares que rodean el núcleo basolateral (Levey et al., 1993; Fuxe et al., 2003).

## 4.2.4. Receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub>

### 4.2.4.1. Estructura de los receptores D<sub>2</sub>

Se ha reportado que los receptores D<sub>2</sub> poseen siete dominios transmembranales con su amino y su carboxilo terminal localizados en los espacios extra e intracelular respectivamente. En estudios de clonación se han identificado tres subtipos de receptores pertenecientes a la familia D<sub>2</sub>: los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> y dos variantes de los receptores D<sub>2</sub>, D<sub>2L</sub> y D<sub>2S</sub> (Bonci y Hopf, 2005). Las dos variantes de los receptores D<sub>2</sub> son expresados por el mismo gen, pero difieren estructuralmente en la cantidad de aminoácidos que poseen en el tercer bucle intracelular, 414 para el D<sub>2S</sub> y 443 para el D<sub>2L</sub> (Siegel et al. 1994).

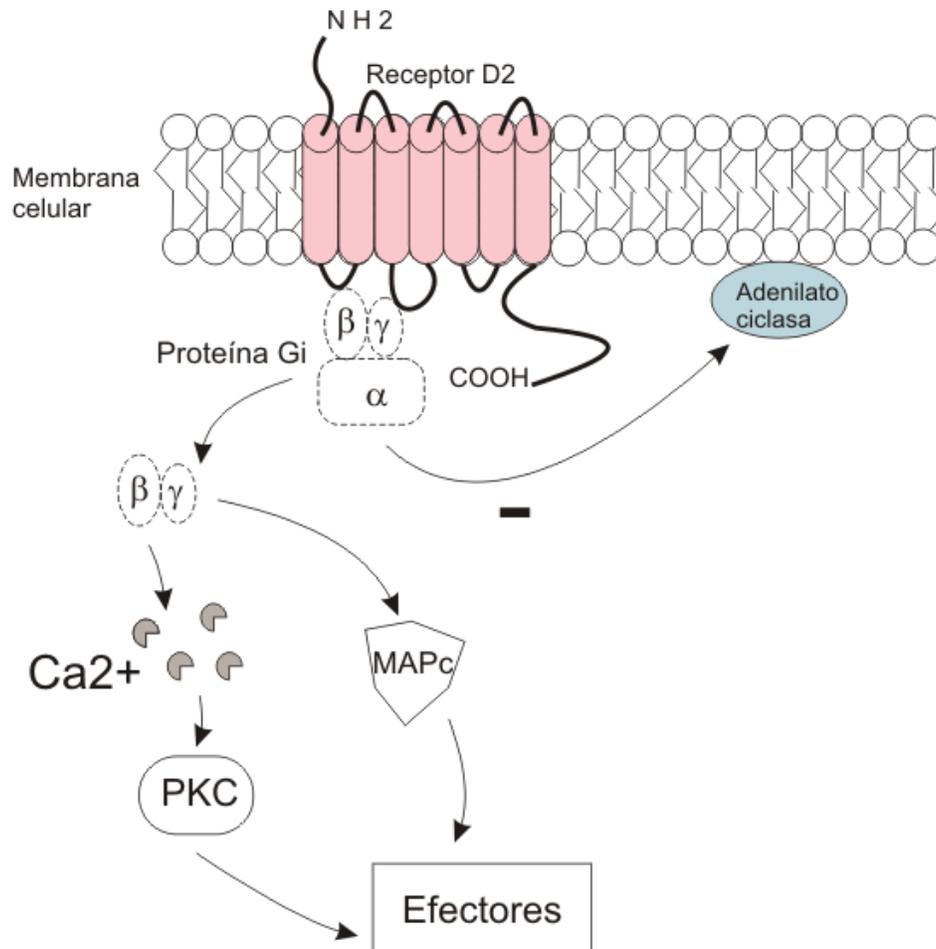


**Figura 12. Estructura de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>.** Obsérvese que los receptores de este tipo poseen siete bucles transmembranales y que sus extremos amino y carboxilo terminales se encuentran en el compartimento extra e intracelular respectivamente (Tomado de Yao et al., 2008).

### 4.2.4.2. Sistemas de transducción

Al estar unidos a una proteína inhibidora G<sub>i</sub>, cuando una neurona dopaminérgica con receptores D<sub>2</sub> recibe un potencial de acción, éstos inhiben la actividad de la adenilato ciclasa con lo que se reduce la formación de AMPc, también se inhibe la entrada de calcio a través de los canales para este ión

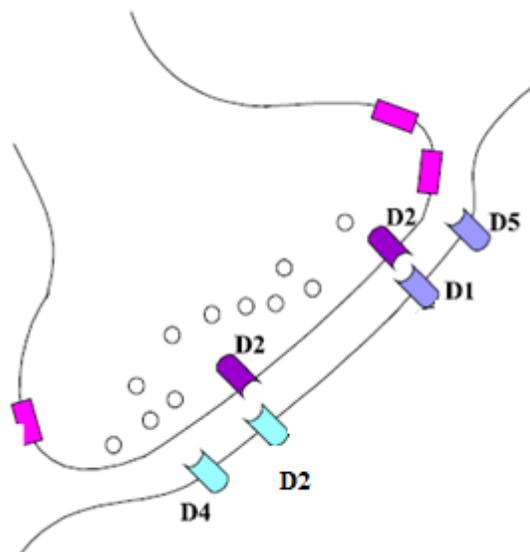
dependientes del voltaje y aumenta la conductancia al  $K^+$  (figura 12). El efecto neto de todo esto es una hiperpolarización de la neurona postsináptica (Guyton y Hall, 2001; Bonci y Hopf, 2005).



**Figura 13. Sistema de transducción del receptor D<sub>2</sub>.** El receptor D<sub>2</sub> está unido a una proteína G inhibidora de la adenilato ciclasa y por lo tanto de la producción de AMPc. Las unidades beta y gamma de la proteína G actúan inhibiendo la entrada de calcio y aumentando la conductancia del potasio; a su vez se activan los sistemas de proteínas cinasas PKC y MAP, dando lugar a la acción de los efectores y a la hiperpolarización de la neurona (basado en Cooper et al., 2003).

#### 4.2.4.3. Receptores tipo $D_2$ postsinápticos y presinápticos

Los receptores de la familia  $D_2$  tienen la peculiaridad de estar presentes tanto en la membrana de la neurona presináptica como en la postsináptica. Los receptores presentes en las neuronas presinápticas reciben el nombre de autorreceptores, ya que actúan controlando la síntesis y la liberación de dopamina por medio de mecanismos de retroalimentación. La estimulación de autorreceptores en las regiones somatodendríticas de las neuronas dopaminérgicas reduce la tasa de disparo de estas neuronas, mientras que la estimulación de autorreceptores en la terminal nerviosa inhibe la síntesis y liberación de dopamina. De esta forma, los autorreceptores somatodendríticos y los de las terminales nerviosas trabajan en conjunto para modular la transmisión dopaminérgica (Cooper et al., 2003; Kandel et al., 2000; Jucaite, 2002).



**Figura 14. Ubicación de receptores presinápticos  $D_2$  en una neurona dopaminérgica.** Los autorreceptores o receptores presinápticos regulan la liberación de dopamina (imagen tomada de Jucaite, 2002).

Los autorreceptores son de 5 a 10 veces más sensibles a los efectos de la dopamina y la apomorfina, un agonista dopaminérgico que los receptores postsinápticos, pues parece ser que dichos autorreceptores funcionan en un estado de alta afinidad para estos ligandos. Cuando se administran dosis bajas de apomorfina, predominan los efectos de los autorreceptores disminuyendo la actividad dopaminérgica, mientras que a altas dosis de este compuesto el efecto predominante es el postsináptico con el consecuente aumento de la función dopaminérgica (Cooper et al., 2003).

#### *4.2.4.4. Localización de receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub>*

Aunque los receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub> están localizados en áreas cerebrales similares (corteza cerebral, estriado, hipocampo, cerebelo, tálamo, septum, sustancia nigra, bulbo olfatorio y colículos inferiores), la distribución de cada uno de sus subtipos (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) varían de una región a otra del cerebro, como se muestra a continuación.

#### *4.2.4.5. Distribución cerebral de los receptores tipo D<sub>2</sub>*

Aunque distintos marcadores para receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub> pertenecientes a la familia del mismo nombre se han encontrado en numerosas regiones del cerebro de la rata, su densidad varía considerablemente en ellas. Una elevada densidad del RNAm que codifica para este subtipo de receptor se ha encontrado en: el globo pálido, corteza prefrontal, cingulada, entorrinal y piriforme, septum, neostriado, bulbo olfatorio, área tegmental ventral, núcleo accumbens, glándula pituitaria, caudado putamen, sustancia nigra pars compacta, núcleo cama de la estría terminal, núcleos hipotalámicos, colículos superiores e inferiores, área gris central y periacueductal, locus coeruleus y núcleos del rafe (Bouthenet et al., 1991; Brock et al., 1992; Fox et al., 1993; Mansour y Watson, 1995). Ya que la presencia de RNAm en un tejido determinado solo refleja la expresión del gen que codifica para una proteína y no sus niveles, es necesario recurrir a técnicas de

autorradiografía y/o inmunohistoquímicas para confirmar la presencia real de la proteína en dicho tejido. Así, mediante técnicas autorradiográficas se ha confirmado la presencia del receptor D<sub>2</sub> en la sustancia nigra pars compacta, globo pálido, bulbo olfatorio, corteza frontal, estriado y septum (Levey et al., 1993; Brock et al., 1992).

Una concentración moderada de RNAm para receptores D<sub>2</sub> ha sido descrita en las cortezas parietal, retroesplenial y temporal. Una densidad similar de este marcador ha sido vista en la capa granular del giro dentado y en células piramidales del hipocampo, así como en el bulbo olfatorio, pallidum ventral, septum lateral, núcleo septohipotalámico, zona incerta, núcleo preóptico medial, núcleo hipotalámico paraventricular, núcleos pontinos, núcleo del tracto solitario y núcleo vestibular medial (Bouthenet et al., 1991), corroborándose la expresión de la proteína receptora mediante anticuerpos dirigidos en contra de ella en los cuerpos mamilares y capas superficiales de los colículos superiores (Levey et al., 1993), corteza entorrinal, estriado ventromedial, núcleo accumbens, pallidum dorsomedial, área hipotalámica anterior, lateral y dorsal, núcleos del tálamo, zona incerta, área tegmental ventral, área gris central (Brock et al., 1992), corteza endopiriforme (Brock et al., 1992; Maltais et al., 2000), núcleo geniculado medial, núcleo supraóptico, núcleo parabigeminal y claustrum (Maltais et al., 2000).

Por otro lado, se ha hallado una muy baja concentración de RNAm para el receptor D<sub>2</sub> en el subiculum, núcleos talámicos, habenules, núcleo coclear dorsal y cuneato. Una densidad semejante se ha descrito en la capa granular cerebelar (lóbulos 9 y 10) (Bouthenet et al., 1991) el núcleo olfatorio y las porciones hipotalámicas anterior y lateral. (Bouthenet et al., 1991; Mansour y Watson, 1995).

Es importante a este respecto señalar que en el cerebro humano se ha descubierto una alta concentración de RNAm D<sub>2</sub> en los núcleos caudado dorsal y ventral, el putamen dorsal y ventral, y el núcleo accumbens. Una moderada

concentración de RNAm  $D_2$  ha sido encontrada en el globo pálido, el pálido ventral y los núcleos del tálamo, así como en los núcleos geniculado lateral, arcuato, cuerpos mamilares, y en la sustancia nigra pars compacta y reticulata. Los estudios autorradiográficos realizados por los mismos autores han indicado una buena concordancia entre los sitios de unión para este tipo de receptor y los niveles de RNAm señalados arriba (Gurevich y Joyce, 1998).

#### *4.2.4.6. Localización de los receptores $D_2$ en la amígdala*

En la amígdala mediante técnicas de hibridación in situ se ha encontrado una concentración de alta a moderada de RNAm para receptores dopaminérgicos tipo  $D_2$  (Fox et al., 1993), más específicamente en los núcleos basomedial, anterior, medial (Bouthenet et al., 1991) y central de la amígdala (Mansour y Watson, 1995). Así mismo los estudios inmunohistoquímicos realizados han mostrado una moderada densidad de receptores  $D_2$  en esta región (Brock et al., 1992; Sóvágó et al., 2005). Estudios más detallados han reportado que éstos receptores se encuentran concentrados en el núcleo central de la amígdala (Levey et al., 1993, Pérez de la Mora et al., 2009) y más concretamente dentro de su porción lateral y en una región cercana al borde dorsal de dicho núcleo (Pérez de la Mora et al., 2009). Dicha distribución está de acuerdo con los estudios autorradiográficos de Scibilia et al. (1992), quien reportó la localización preferente de los receptores  $D_2$  en el núcleo central.

Aunque la identidad de los autorreceptores dopaminérgicos en el estriado pertenecientes al tipo  $D_2$  es indiscutible, en la amígdala existe controversia, pues aunque Bull et al. (1991) mediante técnicas de voltametría cíclica rápida demostró que la activación farmacológica de estos receptores disminuye la liberación de dopamina, sus resultados no han sido confirmados y Kilts et al. (1988) no encontraron una regulación inhibitoria de la síntesis de dopamina en la amígdala.

#### 4.2.5. Localización de receptores $D_3$ y $D_4$

Se ha encontrado una alta concentración de RNAm para receptores  $D_3$  en las islas de Calleja, núcleos mamilares mediales y laterales, células de Purkinje lóbulo 10 del cerebelo, núcleo cama de la estría terminal, núcleo geniculado medial y ventral, partes granular interna, capa plexiforme y células mitrales del bulbo olfatorio, núcleo preóptico magnocelular, sustancia nigra pars compacta y núcleo accumbens shell (Bouthenet et al., 1991; Mansour y Watson, 1995). En el ser humano se encontró a estos receptores particularmente concentrados en el núcleo caudado dorsal y ventral, putamen dorsal y ventral, núcleo accumbens, corteza occipital, corteza cingulada anterior, islas de Calleja y corteza cerebelar (Gurevich y Joyce, 1999; Suzuki et al., 1998). En contraste con lo anterior en la amígdala sólo se ha reportado una concentración baja de este receptor (Gurevich y Joyce, 1998).

Además, mediante estudios de inmunohistoquímica se observó que el receptor dopaminérgico  $D_4$  está ampliamente distribuido en el cerebro de la rata, mostrando mayor concentración en hipocampo (CA1, CA2, CA3 y giro dentado), corteza frontal, corteza entorrinal, corteza parietal, corteza occipital, caudado putamen, núcleo accumbens, núcleo cama de la estría terminal, bulbo olfatorio, cerebelo, núcleo supraóptico, colículo superior e inferior y sustancia nigra pars compacta y reticulata (Defagot et al., 1997). Así mismo, se observó un moderado marcaje en la corteza piriforme y retroesplenial, muy poca en cerebelo y amígdala (Khan et al., 1998).

### **4.3. Papel del sistema dopaminérgico en la modulación del miedo y la ansiedad**

#### *4.3.1. Acción fisiológica conocida de la dopamina*

La dopamina fue identificada como neurotransmisor hace casi 50 años y desde entonces ha sido objeto de un número extraordinario de publicaciones. La participación de la dopamina se ha estudiado en un gran número de procesos tanto normales como patológicos que incluyen entre otros: las conexiones entre la dopamina y el sistema de reforzamiento (Adinoff, 2004), su participación en la conducta motora y sus implicaciones en la enfermedad de Parkinson (Fahn, 2008), la hiperactividad del sistema dopaminérgico y su relación con trastornos de la atención (Brennan y Arnsten, 2008), el papel significativo que juegan los receptores dopaminérgicos en la esquizofrenia (Conn et al., 2008). Así mismo, se han realizado estudios tendientes a aclarar el papel de posibles alteraciones en la transmisión dopaminérgica en enfermedades tales como el Alzheimer (Lanari et al. 2006), el síndrome de Tourette (Wong et al., 2008), la corea de Huntington (Gil y Rego, 2008), el autismo (Lam et al., 2006) y el trastorno bipolar (Yatham et al., 2005). Aunque estos temas contribuyen a conocer la acción e importancia del sistema dopaminérgico en la regulación de la conducta, existen otros aspectos que se han dejado de lado y que apenas comienzan a estudiarse, tal como ocurre con la participación de este sistema en la modulación del miedo y la ansiedad, tema que se abordará en el siguiente apartado.

#### *4.3.2. Contribución del sistema dopaminérgico en la modulación del miedo y la ansiedad*

Aunque la investigación bioquímica y farmacológica sobre el miedo y la ansiedad se ha centrado esencialmente en el estudio de los sistemas de neurotransmisión gabaérgico y glutamatérgico (Millan, 2003) recientemente el

papel de la dopamina como potente neuromodulador de estos procesos (Millan, 2003; Pezze y Feldon, 2003) ha comenzado a cobrar importancia. Estudios recientes han aportado evidencia de que el sistema dopaminérgico mesolímbico y particularmente el meso-amigdalino participa en el control de la expresión emocional y en la formación, expresión, recuerdo y extinción de memorias afectivas (Pezze y Feldon, 2003, Engin y Treit, 2008). Los resultados obtenidos han resultado sin embargo altamente controversiales pues dada la complejidad del fenómeno y la pobre metodología conductual con la que se cuenta una manipulación dada puede resultar en la producción de efectos ansiogénicos, ansiolíticos o no provocar ningún efecto.

#### **4.4. Estudio del papel de los receptores dopaminérgicos en la modulación del miedo y la ansiedad**

Con el objeto de estudiar el papel de estos receptores, uno de los enfoques que mas resultados ha proporcionado es el farmacológico que se basa en la administración de drogas o fármacos que mimetizan la acción de la dopamina (agonistas) o que la bloquean (antagonistas) y la evaluación conductual de sus efectos sobre el miedo y la ansiedad

##### *4.4.1. Administración sistémica de antagonistas y agonistas de receptores D<sub>1</sub>*

Los resultados obtenidos mediante la administración sistémica del antagonista dopaminérgico D<sub>1</sub>, el SCH 23390, en diversas pruebas de miedo y ansiedad apoyan un papel ansiogénico para los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> pues, en pruebas como el “sobresalto potenciado por el miedo” (De Oliveira et al., 2006), la “conducta de escape producida por un choque” (Reis et al., 2004) y el “congelamiento condicionado” (Inoue et al., 2005), la administración sistémica de este compuesto disminuyó los parámetros de ansiedad medidos en ellas. Existe sin embargo evidencia sobre los efectos ansiogénicos de este bloqueador en

pruebas de estrés psicológico (Kamei et al., 1995) o que no reportan ningún efecto (Timothy et al., 1999).

Otras sustancias administradas de forma sistémica y que también actúan sobre los receptores dopaminérgicos  $D_1$ , han producido resultados poco claros o nulos. De esta manera, el agonista  $D_1$  SKF 38393 no tuvo efectos en la prueba de sobresalto potenciado por el miedo (De Oliveira et al., 2006) ni en el congelamiento condicionado (Kamei et al., 1995).

Por otro lado, la administración sistémica del agonista de receptores dopaminérgicos  $D_1/D_2$ , apomorfina, produjo una disminución del congelamiento condicionado (Kamei et al., 1995) y de las vocalizaciones ultrasónicas (Bartoszyk, 1998) durante pruebas de miedo y ansiedad que indican un papel opuesto para los receptores  $D_1$  en estas respuestas.

#### *4.4.2. Participación de la innervación dopaminérgica de la amígdala y sus receptores $D_1$ en la modulación del miedo y la ansiedad*

Los estudios de inyección sistémica han proporcionado datos muy valiosos acerca del funcionamiento de los receptores dopaminérgicos  $D_1$ , pero si se quiere conocer de forma más específica su funcionamiento y participación, deben realizarse experimentos en áreas bien localizadas y delimitadas del sistema nervioso. Por su relevancia en la investigación del miedo y la ansiedad a continuación se presentan los resultados de estudios destinados a explorar farmacológicamente el papel de la neurotransmisión dopaminérgica mediada por receptores  $D_1$ .

##### *4.4.2.1. Pruebas condicionadas*

Guarraci et al. (1999) administraron bilateralmente (2 microg/0.5 microl) de forma intra-amigdalina el antagonista  $D_1$  SCH 23390 en ratas que fueron

sometidas a la prueba de congelamiento condicionado, el cual se considera como un índice de miedo y ansiedad. Sus resultados mostraron efectos ansiolíticos, pues la administración de este antagonista resultó en una disminución del congelamiento tanto antes como después del condicionamiento a un tono acústico, indicando que la transmisión dopaminérgica mediada por receptores D<sub>1</sub> facilita tanto la adquisición como la retención de la respuesta (miedo). En el mismo estudio, se confirmó la conclusión anterior pues la administración del agonista D<sub>1</sub> SKF 38393 (1 microg/0.5 microl) tuvo efectos opuestos (ansiogénicos).

De igual forma, en la prueba de sobresalto potenciado por el miedo, la micro-inyección bilateral amigdalina del antagonista D<sub>1</sub> SCH 23390 antes del entrenamiento en dosis de 3 microg/ 1microl/lado, redujo de forma significativa la respuesta de sobresalto cuando se presentó un estímulo luminoso condicionado junto con un sonido estridente indicando la presencia de efectos ansiolíticos (Waddington-Lamont y Kokkinidis, 1998).

En conclusión, estos resultados sugieren que los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> que se encuentran en la amígdala contribuyen a la adquisición y expresión del miedo condicionado.

#### *4.4.2.2. Pruebas no condicionadas*

Recordemos que las ratas instintivamente perciben ciertos estímulos como amenazantes sin necesidad de un aprendizaje previo. En las pruebas no condicionadas se explota esta aversión natural para estudiar los procesos de miedo y ansiedad. En congruencia con los resultados anteriores, el uso experimental de paradigmas no condicionados llevó a conclusiones similares a las obtenidas con pruebas condicionadas

El grupo de Pérez de la Mora et al., (2005) demostró que cuando las ratas son sometidas a la prueba de la caja luz-oscuridad después de la administración

intra-amigdalina bilateral de SCH23390 (30 ng y 120 ng/lado), éstas disminuyen su latencia para entrar al compartimento iluminado de la caja y además pasan más tiempo en él. Es decir, presentan un menor índice de miedo y ansiedad al exponerse por más tiempo a un estímulo que normalmente evitarían, es decir, a la luz.

Igualmente se ha usado como índice de miedo y ansiedad el sobresalto natural que les produce a las ratas un sonido estridente. Utilizando una prueba derivada de esta aversión, el sobresalto acústico, Stevenson y Gratton (2004) mostraron que después de la administración bilateral local amigdalina de SCH 23390 las ratas disminuyeron la amplitud del sobresalto (dosis 3.2 y 6.4 microg/0.5 microl).

En conclusión, las evidencias presentadas en este apartado, provenientes tanto de modelos condicionados y no condicionados indican que la neurotransmisión dopaminérgica mediada por receptores  $D_1$  participa en la modulación del miedo y la ansiedad pareciendo tener un papel ansiogénico.

## **4.5. Estudio de los receptores $D_2$ en la modulación del miedo y la ansiedad**

### ***4.5.1. Administración sistémica de antagonistas y agonistas de receptores $D_2$ y sus efectos en el miedo y la ansiedad***

La neurotransmisión dopaminérgica aparte de influenciar al miedo y la ansiedad a través de sus receptores  $D_1$ , parece también involucrar la activación de receptores  $D_2$ . A continuación se exponen los resultados de estudios que han usado tratamientos sistémicos para estudiar la participación de estos receptores.

#### **4.5.1.1. Pruebas condicionadas**

El haloperidol es un neuroléptico atípico antagonista de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>. Actualmente es usado para el tratamiento de estados psicóticos, pero también se ha evaluado su acción en el miedo y la ansiedad.

Utilizando la prueba del congelamiento condicionado Inoue et al. (2005) encontraron que inyectando haloperidol en dosis de 3 mg/kg en ratas antes del condicionamiento al miedo y realizando una prueba de retención a los 7 días después del condicionamiento, disminuye de forma significativa la conducta de congelamiento durante la prueba. Además, este resultado se vio potenciado, es decir, disminuyó aún más la respuesta cuando el haloperidol se inyectó junto con el antagonista D<sub>1</sub> SCH 23390 (0.03 mg/kg). De igual forma, Inoue et al. (1995) demostraron también en ratas que el antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub>, raclopride (3-30 mg/kg, s.c.), redujo el miedo condicionado en la misma prueba.

Por otro lado, la administración de sulpiride, otro antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub> ha arrojado resultados controversiales. Cuando este compuesto se inyectó (20 mg/kg) en ratas sometidas a una prueba de condicionamiento clásico luz-choque, disminuyeron de forma significativa los escapes de la rata al percibir el estímulo condicionado, sugiriendo la producción de efectos ansiolíticos (Reis et al., 2004). Efectos similares fueron descritos por Ponnusamy et al. (2005) en ratones pues descubrieron que la inyección sistémica de sulpiride (20 mg/kg), antes de la prueba, facilitaba la extinción del congelamiento condicionado.

#### **4.5.1.2. Pruebas no condicionadas**

Sin embargo, aunque en pruebas no condicionadas algunos efectos ansiolíticos han sido reportados (Rodgers et al., 1994), la administración de sulpiride provocó respuestas de tipo ansiogénico en la prueba de evitación de la luz aumentando de forma significativa la conducta de evitación del lado iluminado

de la caja (Reis et al., 2004), sugiriendo la existencia de efectos ansiogénicos. Los efectos producidos por este fármaco parecen entonces depender de las condiciones experimentales usadas.

En apoyo de Reis et al. (2004), pero en contra de lo reportado por Rodgers et al., 1994) en el laberinto elevado en forma de "+", Timothy et al., (1999) encontraron que el raclopride a diferencia del sulpiride induce efectos ansiogénicos. En sus experimentos, Timothy et al., (1999) probaron diversas dosis de raclopride (0.05, 0.10 mg/kg) administrándolo de forma sistémica en ratas sometidas a la prueba conocida como caja luz-oscuridad que explota la aversión innata que presentan los roedores por los lugares iluminados intensamente y encontraron una disminución en la latencia inicial para dejar el compartimiento iluminado, un aumento en el tiempo para regresar a él y una disminución en el tiempo total de permanencia en dicho compartimiento. Coincidiendo con los efectos reportados por Timothy et al., (1999), Siemiakowski et al., (2004), también obtuvieron efectos ansiogénicos en la prueba de campo abierto, con una dosis de raclopride de 500 microg/kg las ratas se mantuvieron por más tiempo junto a las paredes de la caja y menos tiempo explorando sus espacios centrales, que potencialmente resultan peligrosos.

Una vez analizados los antagonistas de receptores D<sub>2</sub>, ahora se revisaran a los agonistas, donde también se han encontrado datos controversiales u opuestos. En la prueba de sobresalto potenciado por el miedo el quinpirole inyectado de forma sistémica antes de la prueba, redujo de forma significativa el sobresalto y la conducta de congelamiento (0.1 y 0.25 mg/kg) (De Oliveira et al., 2006), al igual que disminuyó el tiempo total de vocalizaciones emitidas durante la prueba de "vocalizaciones ultrasónicas" (0.03, 0.1, 1 mg/kg, s.c.) (Bartoszyk, 1998). Dichos efectos sugieren que la administración de este agonista resulta en la producción de efectos ansiolíticos. Por su parte, LeDoux y Nader (1999) usando un interesante procedimiento de condicionamiento de segundo orden, en el que un segundo estímulo condicionado evoca la respuesta al estímulo al que se

condicionó inicialmente al animal y permite descartar efectos sobre la percepción del estímulo condicionado, encontraron que la inyección sistémica de este agonista  $D_2$  bloquea de forma dosis dependiente la adquisición del condicionamiento de segundo orden (0.05, 0.5 y 5 mg/) indicando también la producción de efectos ansiolíticos. En contraste con estos resultados, el quinpirole en experimentos diseñados para estudiar el efecto de este agonista sobre la extinción se encontró que tanto en rata (Nader y LeDoux, 1999) como en ratones (Ponnusamy et al., 2005) la administración de quinpirole bloquea la extinción sugiriendo un papel ansiogénico para los receptores  $D_2$ .

En conclusión, los resultados mostrados en este apartado muestran que el sistema dopaminérgico tiene una participación significativa en la modulación del miedo y la ansiedad, pero que los efectos de los fármacos agonistas y antagonistas varían dependiendo de si la prueba es condicionada o no condicionada. Finalmente, es importante mencionar que los estudios sistémicos ofrecen una visión global de la acción del sistema en cuestión, pero es necesario identificar que regiones actúan y de qué forma participan en la construcción de un fenómeno.

#### ***4.5.2. Participación de la innervación dopaminérgica de la amígdala y sus receptores $D_2$ en la modulación del miedo y la ansiedad***

Los estudios a nivel sistémico brindan un panorama general sobre la participación de un sistema en un fenómeno, pero es de crucial importancia aclarar que partes del sistema actúan y cuál es su función. Para que ocurran los fenómenos de miedo y ansiedad probablemente es necesaria la activación de diversas áreas cerebrales, pero ya desde los estudios de Klüver y Bûcy (1949), la amígdala ha mostrado tener una función significativa en el procesamiento del miedo y la ansiedad (para ampliar la información ver el apartado 3.1.4.).

En el siguiente apartado se presentan los estudios enfocados a la subfamilia de receptores D<sub>2</sub> presentes en la amígdala y su participación en el procesamiento del miedo y la ansiedad.

Greba et al., (2001) realizaron un estudio aplicando infusiones bilaterales intra-amigdalinas del antagonista D<sub>2</sub> raclopride y observaron sus efectos en la interesante prueba de sobresalto potenciado por el miedo. En esta prueba como se señaló con anterioridad, se condiciona al animal a recibir un choque junto con un estímulo luminoso, una vez que se ha realizado la asociación se les presenta un sonido muy estridente a la vez que están en alerta esperando el choque eléctrico, de este modo las ratas responden con un sobresalto “potenciado” o aumentado por ambos estímulos amenazantes. Cuando se presentó el estímulo condicionado en el grupo control se potenció el sobresalto producido por el estímulo acústico, pero en cambio disminuyó en los grupos a los que se les inyectó las dosis de raclopride de 2, 4 y 8 µg/0.5 µl en ambas amígdalas. Posteriormente, en la prueba de retención realizada dos días después, las ratas fueron sometidas al mismo procedimiento para comprobar la fuerza de la asociación y se observó que en los grupos de 4 y 8 µg/0.5 µl, no se dio ninguna potenciación o aumento en la prueba. Es decir las infusiones intra-amigdalinas de raclopride afectaron de forma significativa y negativa el sobresalto, ya que las ratas se sobresaltaron menos se considera éste como un efecto ansiolítico, tanto en la fase de adquisición como en la de retención. Además se corrobora que el efecto es resultado de la acción en el fenómeno de miedo, pues pruebas especializadas descartan que sea resultado de una afectación sensoriomotora o de la percepción del choque eléctrico.

Resultados similares fueron observados por Guarraci et al. 2000, con el antagonista D<sub>2</sub> eticlopride. Este grupo de investigación midió el congelamiento condicionado inyectando en ambas amígdalas una dosis de 1 µg/0.5 µl de este antagonista, tanto antes como después del condicionamiento, resultando que el grupo al que se inyectó eticlopride antes del condicionamiento mostró de forma

significativa menos congelamiento en la prueba de retención y no hubo alteración motriz ni de reactividad al choque.

En la tabla 7 se indica en forma resumida los fármacos con acción sobre los receptores  $D_2$  que han sido utilizados para desentrañar el papel de estos receptores en la modulación del miedo y la ansiedad junto con el tipo de efectos que poseen y sus efectos farmacológicos en los diversos paradigmas utilizados.

Dentro de la extensa literatura existente, los estudios presentados en ese apartado son los únicos que investigan el efecto de la inyección intra-amigdalina en el miedo y la ansiedad. De ambos estudios se puede inferir que, al parecer, los receptores dopaminérgicos de la subfamilia  $D_2$  de la amígdala participan en el procesamiento del miedo y la ansiedad, y que según los resultados obtenidos, estos receptores juegan un papel de tipo ansiogénico. Es importante resaltar que en los estudios donde se ha probado el efecto de fármacos con acción sobre receptores  $D_2$  en la amígdala se han utilizado exclusivamente modelos condicionados y que sería deseable tener información sobre sus efectos en pruebas no condicionadas que de forma innata inducen una respuesta de alarma en el sujeto.

**Tabla 7. Fármacos con acción dopaminérgica sobre receptores D2 y sus efectos en pruebas conductuales de miedo y ansiedad.**

Fármaco	Acción farmacológica	Administración y dosis	Prueba	Efecto	Referencia
Haloperidol	Antagonista	IP (3 mg/kg)	Miedo condicionado	Disminuye la conducta de congelamiento	Inoue et al., 2005
Sulpiride	Antagonista	IP (20 mg/kg)	Miedo condicionado	Disminuye conducta de escape ante el EC	Reis et al., 2004
Sulpiride	Antagonista	IP (20 mg/kg)	Miedo condicionado	Facilita la extinción del congelamiento	Ponnusamy et al., 2005
Sulpiride	Antagonista	IP (40 mg/kg)	Prueba de evitación de la luz (no condicionada)	Aumenta el número de escapes del lado iluminado	Reis et al., 2004
Raclopride	Antagonista	IP (0.05 y 0.10 mg/kg).	Caja luz-oscuridad	Disminuye la latencia inicial para dejar el compartimiento iluminado. Aumenta en el tiempo que tardaron en regresar a explorarlo. Disminuye el tiempo total en el lado iluminado de la caja	Timothy et al., 1999
Raclopride	Antagonista	IP (500 microg/kg)	Prueba de campo abierto (no condicionada)	Menor tiempo explorando el cuadro central	Siemiakowski et al., 2004
Quinpirole	Agonista	IP (0.1 y 0.25 mg/kg)	Sobresalto potenciado por el miedo	Reduce del sobresalto potenciado por el miedo y la conducta de congelamiento.	De Oliveira et al., 2006
Quinpirole	Agonista	SC (0.03, 0.1, 1 mg/kg)	Vocalizaciones ultrasónicas	Disminuye el tiempo total de vocalizaciones	Bartoszyk, 1998
Quinpirole	Agonista	IP (0.05, 0.5 y 5 mg/kg)	Condicionamiento de segundo orden al miedo	Bloquea la adquisición de condicionamiento de segundo orden	LeDoux y Nader, 1999
Quinpirole	Agonista	IP (0.5 mg/kg)	Condicionamiento de segundo orden al miedo	Bloquea la extinción	LeDoux y Nader, 1999
Quinpirole	Agonista	IP (1 mg/kg)	Miedo condicionado	Bloquea la extinción	Ponnusamy et al., 2005
Raclopride	Antagonista	2, 4 y 8 µg/0.5 µl, en ambas amígdalas	Sobresalto potenciado por el miedo	Disminuye la amplitud del sobresalto	Greba et al., 2001
Eticlopride	Antagonista	1 µg/0.5 µl, en ambas amígdalas	Congelamiento o condicionado	Disminuye la conducta de congelamiento	Guarraci et al., 2000

\*Los agonistas y antagonistas considerados en esta tabla muestran también efectos sobre los receptores D<sub>3</sub>



## Capítulo 5

### Justificación y objetivos

#### 5.1. Justificación

El miedo y la ansiedad son reacciones normales frente a estímulos peligrosos o potencialmente peligrosos. El enfoque neurobiológico indica que no parece existir un único sistema de neurotransmisión o estructura en particular encargada de generar o modular estas respuestas. Sin embargo, se ha sugerido que el complejo amigdalino juega un papel preponderante en el desencadenamiento de respuestas autónomas, hormonales y conductuales ante un evento que amenaza la integridad de un individuo. (LeDoux, 1996; Davis y Whalen, 2001; Heinze, 2003; Millan, 2003; Debiec y LeDoux, 2004).

Se han delimitado y estudiado importantes proyecciones dopaminérgicas que van del área tegmental ventral en el mesencéfalo a la amígdala (Cooper et al., 1996; Asan, 1997; Pérez de la Mora et al., 2009) y se ha obtenido considerable evidencia de que el sistema dopaminérgico amigdalino juega un papel crucial en la generación del miedo y la ansiedad (para una revisión exhaustiva sobre el tema ver Pérez de la Mora et al., 2009). A este respecto, se ha estudiado el papel de los receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> de la amígdala tanto en el miedo condicionado (Waddington-Lamont y Kokkinidis, 1998) como no condicionado (Pérez de la Mora et al., 2005) y de los receptores D<sub>2</sub> en el miedo condicionado (Guarraci et al., 2000; Greba et al., 2001).

Ya que no se cuenta con información acerca del papel de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> amigdalinos en el miedo no condicionado se consideró necesario explorar el papel que estos receptores tienen en este fenómeno estudiando los efectos conductuales que resultan de su inhibición en un

paradigma no condicionado, el enterramiento defensivo, que cuenta con una sólida base etológica. Dado que el bloqueo de los receptores  $D_1$  en la amígdala resulta en efectos ansiolíticos tanto en pruebas condicionadas ((Waddington-Lamont y Kokkinidis, 1998) como no condicionadas (Pérez de la Mora et al., 2005), y la administración de antagonistas  $D_2$  producen este mismo tipo de efectos (Guarraci et al., 2000; Greba et al., 2001) en pruebas condicionadas, se consideró razonable suponer que el bloqueo de los receptores  $D_2$  con raclopride tendría efectos ansiolíticos en pruebas no condicionadas de miedo y ansiedad. Para comprobar que la muestra bajo estudio seguía una distribución normal en este trabajo se utilizó el análisis de Kolmogoroff-Smirnof y posteriormente se aplicó la prueba estadística de ANOVA de una vía para grupos independientes.

## **5.2. Objetivo general**

Determinar la participación de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  de la amígdala en el miedo y la ansiedad mediante la evaluación de los efectos conductuales que resultan de su inhibición en el paradigma de enterramiento defensivo.

## **5.3. Objetivos particulares**

Examinar los efectos conductuales de la administración bilateral intra-amigdalina de raclopride, un antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  en el paradigma de enterramiento defensivo.

## **5.4. Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los efectos de la administración intra-amigdalina del antagonista de los receptores  $D_2$  raclopride en las conductas de miedo y ansiedad de ratas sometidas al paradigma de enterramiento defensivo?

## **5.5. Hipótesis general**

Si la activación fisiológica de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  de la amígdala aumenta las conductas de miedo y ansiedad, entonces el bloqueo de estos receptores disminuirá las conductas de miedo y ansiedad en el paradigma de enterramiento defensivo.

## **5.6. Hipótesis particular**

Si fisiológicamente la activación de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  amigdalinos aumentan las conductas de miedo y ansiedad, su bloqueo con el antagonista de receptores  $D_2$  raclopride, resultará en un decremento del tiempo y la latencia de enterramiento, la altura del aserrín, el número de choques recibidos y de aproximaciones al electrodo, en la prueba del enterramiento defensivo.

# Capítulo 6

## Método

### 6.1. Variables

#### 6.1.1. Variable independiente

##### *Definición conceptual*

El tratamiento farmacológico se refiere al antagonista D<sub>2</sub> utilizado (raclopride) y las diversas dosis administradas antes de la prueba conductual.

##### Definición operacional

Las dosis intra-amigdalinas administradas de raclopride fueron 0, 0.73, 2 y 4 µg/lado. Se usó solución salina fisiológica como vehículo.

#### 6.1.2. Variables dependientes

##### *Definición conceptual*

El miedo y la ansiedad son mecanismos naturales de afrontamiento que aparecen cuando la homeostasis del individuo se ve amenazada por un peligro real o potencial y que resultan en una serie de manifestaciones subjetivas, autónomas, endócrinas, musculares y conductuales, destinadas a preparar al sujeto a encarar la situación que lo amenaza. En el presente trabajo los efectos del bloqueo de los receptores D<sub>2</sub> sobre la conducta de enterramiento, que representa una conducta defensiva del animal ante la amenaza de un electrodo electrificado fueron medidos

##### *Definición operacional*

En esta investigación los efectos del bloqueo de los receptores D<sub>2</sub> con raclopride sobre el miedo y la ansiedad se midieron de forma conductual en el paradigma de

enterramiento defensivo, tomando como indicadores de estas conductas, los parámetros de tiempo y latencia de enterramiento, el número de choques recibido y de las aproximaciones que el animal tuvo hacia el electrodo. Asimismo se evaluó el número de episodios de enterramiento, así como la altura del aserrín acumulado sobre el electrodo.

*Tiempo de enterramiento.* Número total de segundos que dedicó la rata a arrojar aserrín con sus patas delanteras hacia el electrodo después de haber recibido al menos un choque eléctrico. El período de medición fue de 10 minutos totales, independientemente de la conducta de la rata.

*Latencia de enterramiento.* Latencia es el intervalo de tiempo (segundos) entre el momento que la rata recibe el primer choque eléctrico e inicia el primer episodio de enterramiento.

*Número de choques recibido.* Número total de choques que recibió la rata al explorar libremente el electrodo en un período de 10 minutos.

*Aproximaciones al electrodo.* Número de veces que la rata se acercó a explorar el electrodo pero no llegó a recibir un choque eléctrico, en un período de 10 minutos.

*Número de episodios de enterramiento.* Un episodio de enterramiento fue aquel donde la rata inició la conducta de enterramiento y la concluyó algunos segundos después, se contaron el número de episodios que ocurrieron durante 10 minutos de la prueba.

*Altura del aserrín.* Centímetros de altura que alcanza el aserrín sobre el electrodo después de someter a la rata por 10 minutos en la prueba de enterramiento defensivo.

### 6.1.3. Variables extrañas

La administración del antagonista de receptores D<sub>2</sub> raclopride podría afectar la locomoción normal de la rata. Con el fin de controlar esta variable extraña se realizó inmediatamente después de la prueba de enterramiento defensivo, la prueba de campo abierto.

#### *Definición conceptual*

La locomoción es la acción de un organismo de desplazarse o moverse de un lugar a otro. Dicha variable se midió mediante la prueba de campo abierto, en donde se monitorea el desplazamiento del animal en una caja o arena durante un determinado intervalo de tiempo.

#### *Definición operacional*

La prueba de campo abierto se realizó en una caja con una superficie blanca de 50 x 50 cm, con paredes de 30 cm de acrílico transparente, mismas que soportan un marco metálico que a su vez contiene los sensores de locomoción. El registro de locomoción se realizó mediante un sistema de coordenadas con 10 posibles posiciones en el eje X y la misma cantidad en el eje Y, lo que nos permite conocer la posición del sujeto. Se miden tres parámetros: el número de eventos, el número de levantamientos y la distancia recorrida. La duración de la prueba es de 5 minutos.

*Evento.* Ocurre cuando la rata interrumpe una coordenada formada por los haces de luz en la prueba de campo abierto. Posteriormente se contabilizan el número de eventos que ocurrieron en 5 minutos.

*Número de levantamientos.* Frecuencia con que la rata se levanta en forma vertical sobre sus patas traseras durante 5 minutos en la prueba de campo abierto.

*Distancia recorrida.* Cantidad en metros que recorre la rata durante los 5 minutos de la prueba de campo abierto.

## 6.2. Diseño de investigación

### *Tipo de diseño*

El diseño fue de tipo experimental con un grupo control y tres grupos experimentales y con medición Sólo post-test. Se escogió este diseño para obtener grupos donde los animales fuesen sometidos por una única vez a la inyección del fármaco o solución salina y fueran probados bajo idénticas condiciones en el paradigma de enterramiento defensivo. Con el fin de distribuir equitativamente la variabilidad inter e intra-individual inherente a los animales, estos fueron asignados en sus respectivos grupos de forma aleatoria.

<b>Grupos</b>	
<b>Grupo control</b>	<b>Solución salina al 0.9 %</b>
<b>Grupo experimental 1</b>	<b>Dosis 0.73 µg de raclopride</b>
<b>Grupo experimental 2</b>	<b>Dosis 2 µg de raclopride</b>
<b>Grupo experimental 3</b>	<b>Dosis 4 µg de raclopride</b>

### *Diseño estadístico*

Se usó un diseño estadístico de grupos independientes con medida *a posteriori*. Este diseño estadístico fue utilizado ya que los distintos grupos formados aleatoriamente estaban formados por ratas que fueron sometidas por una única vez a la prueba, y en donde su conducta fue evaluada en una sola ocasión después de la administración del fármaco.

### **6.3. Sujetos**

Se emplearon 113 ratas macho de la cepa Wistar obtenidas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales pesaron de 250 a 260 gramos al día de la cirugía estereotáxica. Posteriormente a la cirugía, se mantuvo a cada rata en una caja individual con libre acceso al agua y comida.

### **6.4. Escenario**

Después de la cirugía las ratas se mantuvieron en un vivarium con una temperatura constante de 22 °C y ciclo luz-oscuridad 12:12 para su recuperación. La experimentación se realizó en el laboratorio AL-204 del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El día del experimento las ratas fueron llevadas del vivarium a un cuarto de conducta sonomortiguado con luz y temperatura controlado en donde se llevaron a cabo las pruebas conductuales de enterramiento defensivo y campo abierto, de acuerdo a las especificaciones que se describen en los siguientes apartados.

### **6.5. Equipo y material**

#### *6.5.1. Caja de enterramiento defensivo*

La caja de enterramiento fue elaborada con acrílico transparente (27 x 16 x 23 cm) y fue construida de acuerdo a las especificaciones de Treit et al. (1994). Contaba con una cama de aserrín con un grosor de 5 cm en el suelo de la caja. En una de las paredes laterales, a 2 cm por arriba de la cama de aserrín, se encontraba fijada una varilla electrificada de 7 cm de largo y 0.5 cm de diámetro. Al hacer contacto el animal con la varilla, éste recibía una descarga eléctrica de 0.4 mA. El electrodo se mantuvo electrificado durante toda la sesión experimental. La corriente fue generada por un aparato fabricado por Lafayette Instruments Inc.

La prueba fue videograbada (VHS Sony, USA) para su posterior calificación etológica.

#### *6.5.2. Caja de campo abierto*

La caja de campo abierto poseía una superficie blanca de 50 x 50 cm, con paredes de 30 cm de acrílico transparente, mismas que soportaban un marco metálico que a su vez contenía los sensores de locomoción. 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 constaban de los emisores de luz en un extremo y de los receptores en el extremo opuesto. El registro de locomoción se realizó mediante un sistema de coordenadas con 10 posibles posiciones en el eje X y la misma cantidad para el eje Y que permita conocer la posición del sujeto. En la medición de la locomoción, un evento fue considerado cuando el animal en su deambular interrumpía los haces de luz que formaban una coordenada. Durante el experimento, el sistema (Software automático OmniAlva 2.0) registró cada coordenada con una resolución de 200 milésimas de segundo. El sistema fue diseñado para registrar la locomoción por cinco minutos.

#### *6.5.3. Fármaco*

Se empleó el antagonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> raclopride (S(-) - raclopride, L (+)- tartrate salt, Laboratorios Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., E.U.A.) en dosis de 0, 0.73, 2 y 4 µg/lado. Se usó solución salina fisiológica como vehículo (NaCl 0.9 %). Las dosis administradas se basaron en la investigación de Greba et al., 2001, con las cuales obtuvieron una reducción significativa del sobresalto en la prueba de sobresalto potenciado por el miedo.

## 6.6. Procedimiento

### 6.6.1. Cirugía.

Las ratas se anestesiaron con clorhidrato de ketamina (170 mg/kg, i.p., Pisa Agropecuaria). Tras eliminar el pelo de la cabeza, el animal se colocó en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA, E.U.A.) con la barra incisora instalada en -3.3 mm. Para lograr una mayor anestesia, previo a la incisión, se aplicó en forma local un espray de lidocaína al 10 % (Xylocaina Spray, Astra Zeneca, México). Posteriormente se insertaron 2 cánulas guía de acero inoxidable (0.46 mm de diámetro externo, 0.24 mm de diámetro interno, 26 gauge, C315G, Plastics One, Roanoke, VA, E.U.A.) de forma bilateral en el núcleo central de la amígdala, utilizando las siguientes coordenadas, de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (2004), con respecto a bregma: anteroposterior -2 mm, lateral +/- 4.2 mm y ventral -7.7 mm del hueso. Inmediatamente después de su colocación las cánulas guía se fijaron con acrílico dental autocurable (Comercializadora y Distribuidora Dental Arias, S.A. De C.V, México, D.F.) y se colocó un mandril protector (Dummy Cannulae, C315DC, Plastics One, Roanoke, VA, E.U.A.) dentro de la cánula para mantenerla permeable. Al término de la cirugía, para evitar infecciones se les aplicó una inyección de antibiótico (1 ml i. m., Fortabencetacil L. A., Fort Dodge Animal Health Laboratorios, México). Finalmente se colocó a las ratas en cajas individuales con agua y comida *ad libitum* para su recuperación.

### 6.6.2. Habitación

Después de 5 a 8 días de recuperación de la cirugía, las ratas fueron manipuladas por 4 días consecutivos antes de la experimentación para habituarlas a las manos del experimentador. La manipulación consistió en una simulación de la infusión intra-amigdalina durante 5 minutos y después fueron colocadas 10 minutos en la caja de experimentación de enterramiento defensivo para su

adaptación al ambiente. La caja tenía la cama de aserrín de 5 cm pero no incluía el electrodo (*para conocer especificaciones de la caja dirigirse a la sección de equipo y material*).

#### *6.6.3. Micro-infusión intra-amigdalina*

Al final del periodo de adaptación las ratas fueron asignadas aleatoriamente al grupo control y los grupos experimentales. En el grupo control se aplicó la micro-infusión del vehículo (solución 0.9 % NaCl). En los grupos experimentales las concentraciones de raclopride que para cada grupo fueron de 0.73 µg, 2 µg y 4 µg respectivamente disueltos en solución salina. Las dosis usadas de raclopride se basaron en las empleadas por Greba et al. (2001). Los animales solo fueron usados en una ocasión y sólo se les aplicó una micro-infusión según el grupo asignado.

La micro-inyección intra-amigdalina del raclopride o de la solución salina se realizó mediante inyectores (33 gauge, 0.100 mm de grosor interno, C3151, Plastics One, Roanoke, VA, E.U.A.) que sustituyeron a los mandriles colocados en ambas cánulas guía. Los inyectores estaban conectados a una tubería (C315C5, Plastics One, Roanoke, VA, E.U.A. Vinyl+Spring, 40 cm) que comunicaba con una bomba de micro-inyección (CMA/Microdialysis, Estocolmo, Suecia), que administraba de forma automática 0.25 nl/lado de la solución respectiva a lo largo de 5 minutos. Después de concluir la administración se mantuvieron los inyectores dentro de las cánulas por 30 segundos más para garantizar la difusión y evitar el regreso del flujo inyectado, a continuación se colocaron de nuevo los mandriles dentro de la cánula guía.

#### *6.6.4. Prueba de enterramiento defensivo*

Inmediatamente después de la inyección de la sustancia se colocó cada animal dentro de la caja destinada a evaluar el enterramiento defensivo y se

esperó a que tocara con las patas anteriores, el hocico o la lengua la varilla electrificada colocada en la caja y recibiera un choque eléctrico. La conducta del animal fue observada en forma remota y video-grabada en un cuarto de conducta sonoamortiguado construido especialmente para este fin. Durante la prueba se mantuvo el cuarto iluminado con luz roja experimento (2.3 a 2.5 luxes) para asemejar el período de oscuridad. La prueba duró 10 minutos y fue videograbada para posteriormente evaluar los indicadores de la altura en centímetros de aserrín, el tiempo de enterramiento, el número de choques y aproximaciones, el número de episodios de enterramiento y la latencia de enterramiento.

#### *6.6.5. Prueba de campo abierto*

Al finalizar la prueba de enterramiento defensivo se pasó al animal a la prueba de campo abierto para realizar la evaluación motora y se le permitió que la explorara durante 5 minutos (*para conocer especificaciones de la caja dirigirse a la sección de equipo y material*).

#### *6.6.6. Análisis Histológico*

Después de concluido el experimento, los animales fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico (Laboratorios Ttokkyo, México, D.F.). Para corroborar el sitio de localización de las cánulas se les micro-inyectó, bajo las mismas condiciones que el raclopride o su vehículo una solución diluida del colorante azul de pontamina (Sigma). Los animales fueron decapitados, se removieron sus cerebros, los cuales fueron fijados en una solución de formaldehído al 10 %. Los cerebros se mantuvieron en esta solución de una a dos semanas y posteriormente se colocaron sucesivamente en soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30 %, permaneciendo un día en cada una de ellas. Los cerebros fueron finalmente congelados y cortados en rebanadas coronales de 40  $\mu\text{m}$  con un Criostato (CM 1510-3, Leica Instruments, Nussloch, Alemania). Para localizar con precisión la posición de las cánulas en el cerebro, los cortes fueron teñidos

mediante la técnica de tinción de Nissl con violeta de cresilo. Posteriormente las rebanadas coronales de cerebro fueron analizadas bajo microscopio para comprobar que las cánulas hubiesen estado insertadas dentro de ambas amígdalas y que al menos una de ellas estuviese localizada en el núcleo central de la amígdala (CeA).

Ya que la posibilidad de tener estereotóxicamente cánulas implantadas bilateralmente en el mismo sitio es muy baja debido a pequeñas diferencias individuales en el tamaño del cerebro de los animales usados y a imprecisiones milimétricas en la colocación de los animales en el aparato estereotáxico, la selección de las ratas para ser incluidas en el análisis estadístico estuvo basada en un criterio equilibrado que consideraba que en al menos en uno de los animales la cánula estaba sobre o muy próxima al sitio deseado y la otra en una posición dentro de amígdala desde la cual el compuesto inyectado pudiera alcanzar en mayor o menor medida el blanco deseado, de acuerdo a los límites de resolución ( $1 \text{ mm}^3$ ) establecidos en el laboratorio a donde se realizó la tesis para la técnica de microinyección usada (Pérez de la Mora et al., 2006). De esta manera la posibilidad de activar al mayor número posible de receptores  $D_2$  que como se señaló antes están, localizados casi exclusivamente en el núcleo central (Scibilia et al., 1992; Mansour y Watson, 1995; Pérez de la Mora et al., 2009) y de disminuir efectos compensatorios de receptores no bloqueados fue incrementada y disminuida respectivamente bajo nuestras condiciones experimentales.

#### *6.6.7. Análisis Estadístico*

Los resultados obtenidos fueron agrupados como promedios  $\pm$  error estándar. Dado que el análisis de Kolmogoroff-Smirnof indicó que la muestra bajo estudio seguía una distribución normal, en este trabajo se utilizó la estadística paramétrica. Para la comparación de los resultados se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida en aquellos casos permitidos ( $p < 0.05$ ) por la prueba de Dunnet que compara los distintos grupos experimentales con

respecto a su control. Como en el caso anterior sólo fueron tomados como resultados significativos aquellos en que la  $p$  fue  $< 0.05$ . Las medidas estadísticas se obtuvieron mediante el Software GraphPad Prisma 4.

#### *6.6.8. Consideraciones éticas*

El tratamiento de los sujetos durante todos los procedimientos se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, así como el Comité de Ética del Instituto de Fisiología Celular.

# Capítulo 7

## Resultados

### 7.1. Análisis histológico

Los sitios de implantación de las cánulas fueron microscópicamente verificados y para el análisis de datos sólo se tomaron aquellos animales en los que ambas puntas de las cánulas estuvieran localizadas dentro de la amígdala y al menos una de ellas en el núcleo central de la amígdala (CeA). Por ello, de un total de 113 ratas canuladas, se excluyeron 65 casos en donde existía algún tipo de daño en los núcleos de la amígdala, infección, enfermedad o una inadecuada ubicación de las cánulas guía. El número total de animales incluidos en el análisis estadístico fue de 48 ratas, distribuidas en cuatro grupos (tabla 8).

**Tabla 8.** Número de ratas finales por grupo experimental.

Grupo	# de sujetos
Grupo control (NaCl 0.9 %)	n = 19
Dosis 0.73 µg de raclopride	n = 8
Dosis 2 µg de raclopride	n = 11
Dosis 4 µg de raclopride	n = 10
	Total = 48

Del total de las 48 ratas incluidas en el análisis estadístico, en 25 se localizaron ambas cánulas de forma bilateral dentro del CeA y en 23 se ubicó sólo una cánula dentro de este núcleo. De las cuales, 13 se ubicaron en la amígdala derecha y 10 en la amígdala izquierda, distribuidos entre los diferentes grupos experimentales, por lo que no se cumplieron los criterios para realizar un análisis estadístico. En las figuras 15 y 16 se muestran esquemáticamente los sitios de implantación de las cánulas en los cerebros de los animales utilizados para el

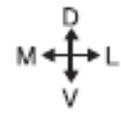
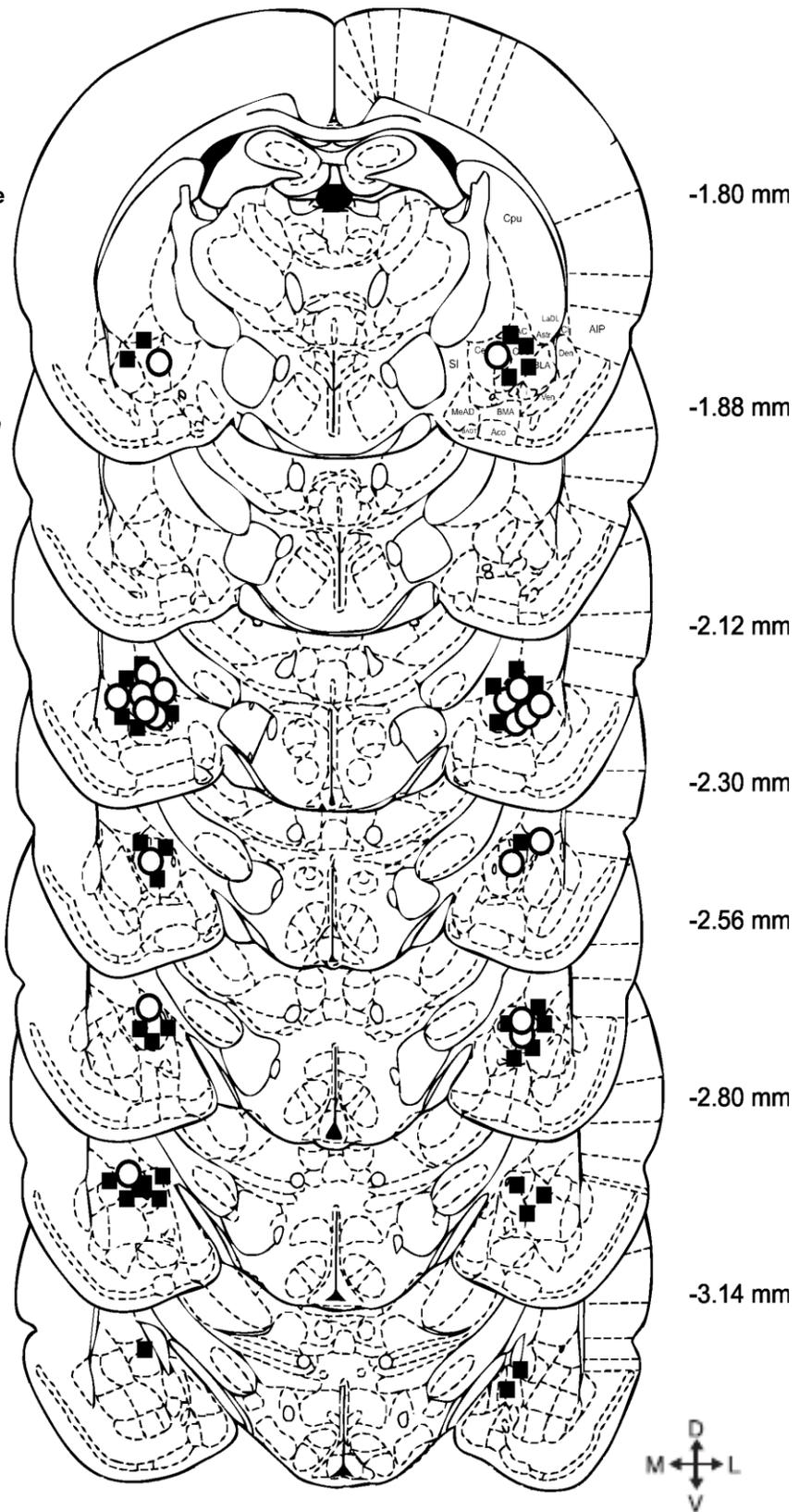
análisis estadístico. Como puede observarse en ambas figuras, las puntas de las cánulas se localizaron entre -1.80 y -3.14 mm posterior al bregma de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson (2004).

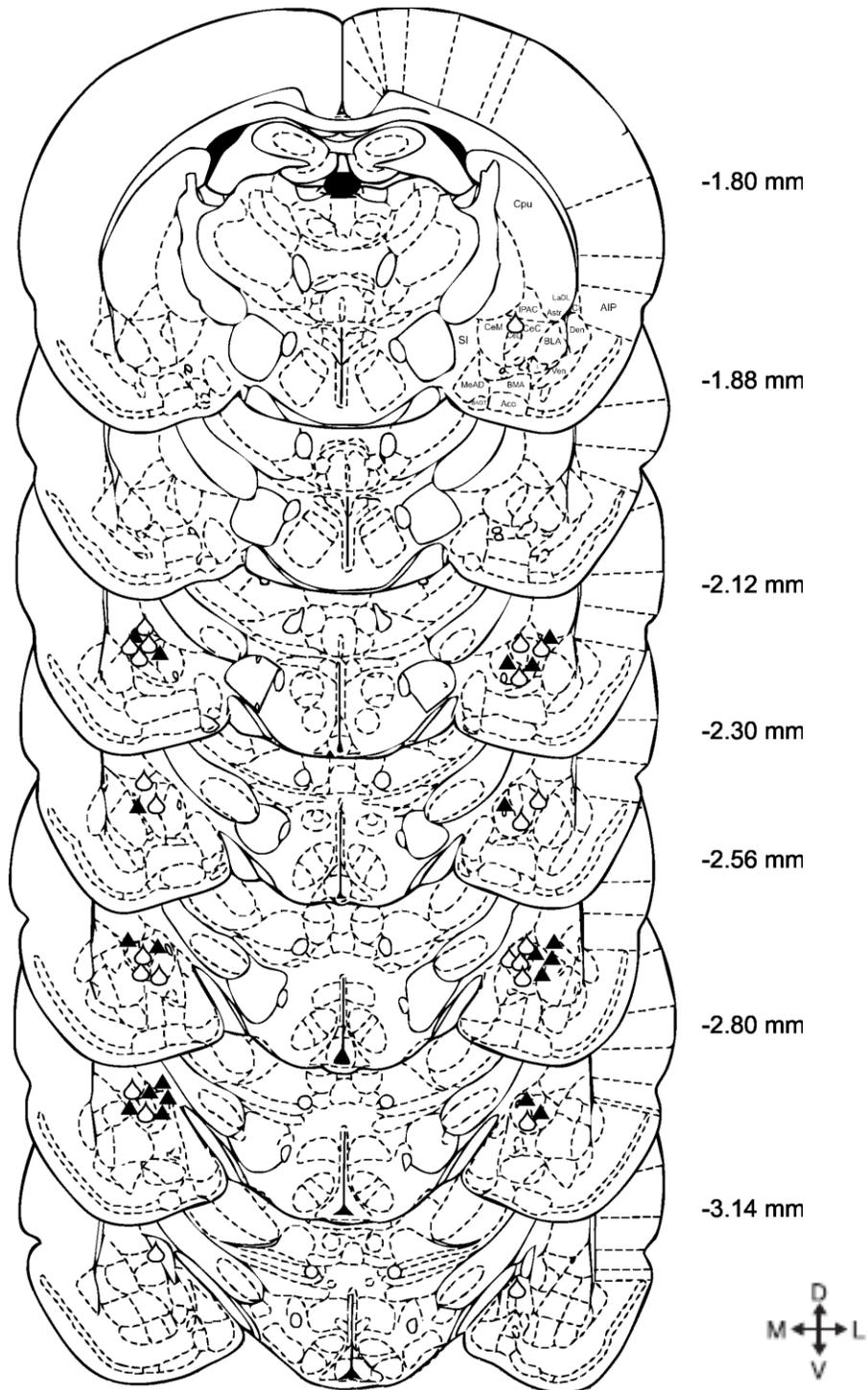
**Figura 15. Representación esquemática de los sitios de implantación de las cánulas en el núcleo central de la amígdala.**

Las representaciones de los cortes coronales del cerebro de rata fueron tomados del atlas de Paxinos y Watson (1998) en las posiciones que se indican con respecto a bregma. Los cuadros negros corresponden a las implantaciones del grupo control y los círculos a las del grupo tratado con raclopride (0.73 mg/lado).

Abreviaturas:

Cpu: caudado putamen;  
 LaDL: núcleo lateral de la amígdala, región lateral;  
 CI: núcleo intersticial caudal del fascículo longitudinal medial; AIP: corteza insular agranular región posterior;  
 DEn: núcleo endopiriforme región dorsal; Astr; SI: sustancia innominata;  
 MeAD: núcleo de la amígdala medial región dorsal;  
 BAOT: núcleo accesorio del tracto olfatorio;  
 ACO: núcleo cortical amigdalino anterior;  
 BMA: núcleo de la amígdala basomedial; VEn: núcleo endopiriforme ventral;  
 CeL: núcleo central división lateral; CeM: núcleo central división medial; BLA: núcleo basolateral de la amígdala;  
 CeC: núcleo central de la amígdala división capsular;  
 IPAC: núcleo intersticial del miembro posterior de la comisura anterior.





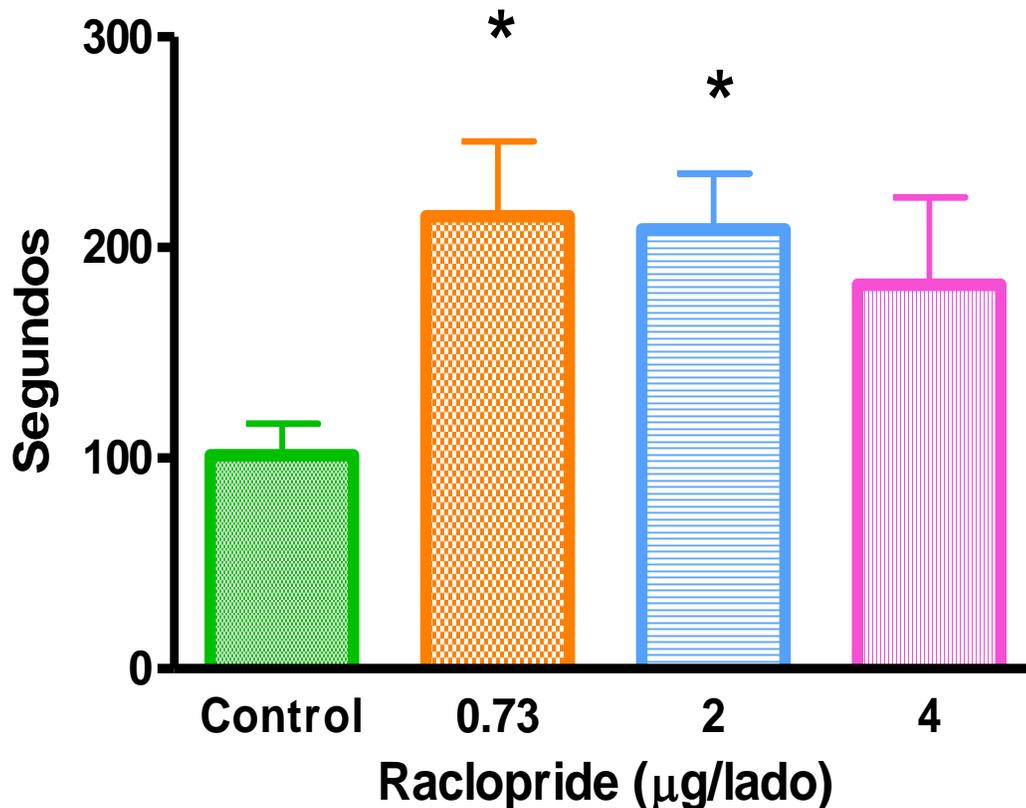
**Figura 16. Esquema de los sitios de implantación de las cánulas en el núcleo central de la amígdala.** *Sitios de implantación de las cánulas correspondientes a los grupos de animales tratados con una dosis de raclopride de 2 y 4 ug/lado. Para más información véase la leyenda de la figura 14.*

## 7.2. Análisis conductual en la prueba del enterramiento defensivo

En el análisis conductual los siguientes parámetros fueron considerados: tiempo de enterramiento, latencia de enterramiento, número de episodios de enterramiento, altura de aserrín, número de choques recibido y aproximaciones al electrodo. En las tablas correspondientes se muestran la media, desviación y error estándar, así como el valor de P para la prueba de Dunnet practicada en cada caso. En las gráficas se indica de forma esquemática la media con su error estándar y la existencia o no de diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control. Los valores de F, así como el valor de P para el análisis de varianza practicado de acuerdo al número de sujetos experimentales indicados para cada grupo se señalan en el pie de figura correspondiente.

### 7.2.1. *Tiempo de enterramiento.*

La inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride indujo un aumento significativo (ANOVA:  $F_{(3, 44)} = 4.627$ ,  $P < 0.0067$ ,  $n=48$ ) en la conducta de enterramiento con respecto a lo observado en este parámetro en los animales control (Figura 17). Dicho efecto se observó desde la dosis más baja del antagonista (0.73  $\mu\text{g/lado}$ ) presentándose una tendencia a disminuir conforme la dosis de este compuesto se incrementó, perdiéndose la significancia estadística a la dosis más alta (4  $\mu\text{g/lado}$ ). Los datos de la media, desviación y error estándar se muestran en la tabla 9, así como los valores de P para la prueba *post-hoc* de comparación múltiple de Dunnet. (Control:  $n = 19$ ; raclopride: 0.73 $\mu\text{g}$ :  $n=8$ ; 2  $\mu\text{g}$ :  $n=11$ ; 4  $\mu\text{g}$ :  $n=10$ ).



**Figura 17. Efecto de la micro-inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride en el tiempo de enterramiento.** *La administración de raclopride incremento el tiempo de enterramiento en la prueba utilizada a partir de la primera dosis probada. El enterramiento tendió a disminuir conforme se administraron dosis más altas. Los resultados se expresan como medias con su respectivo error estándar. El análisis de varianza se analizó mediante una prueba de ANOVA de una vía ( $F_{(3, 44)} = 4.627, P < 0.0067; n = 48$ ) seguida de la prueba de Dunnet para identificar diferencias con respecto al control. \* =  $p < 0.05$  con respecto al grupo control (Control:  $n = 19$ ; raclopride:  $0.73\mu\text{g/lado}$ :  $n = 8$ ;  $2\mu\text{g/lado}$ :  $n = 11$ ;  $4\mu\text{g/lado}$ :  $n = 10$ ).*

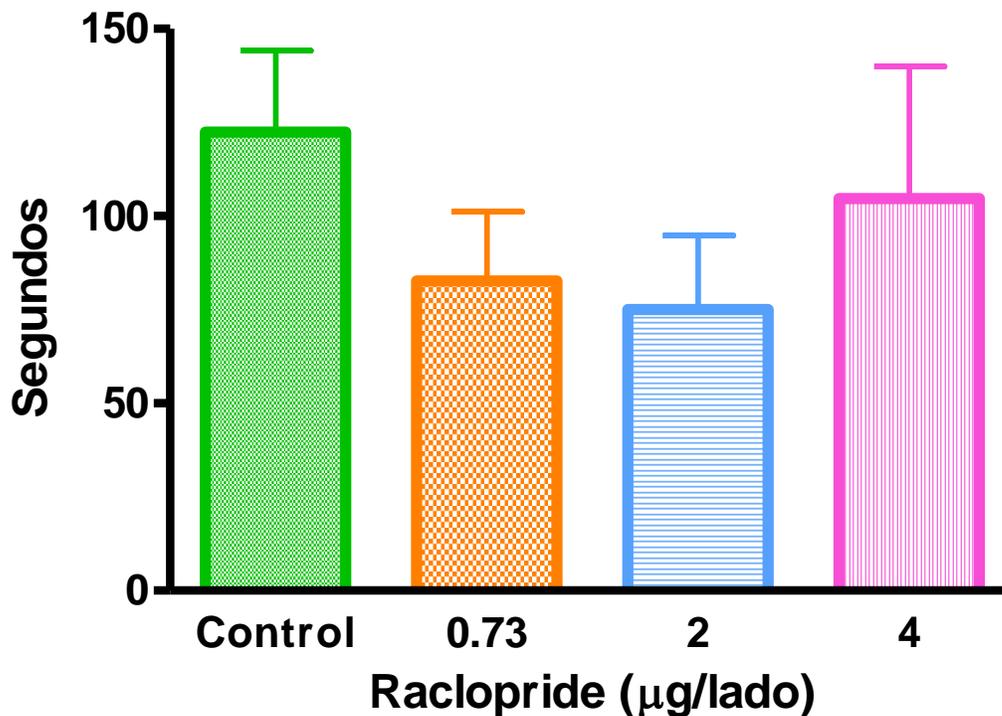
**Tabla 9.** *Análisis descriptivo del tiempo de enterramiento\**

<b>Grupos</b>	<b>Control n =19</b>	<b>0.73 µg n=8</b>	<b>2 µg n=11</b>	<b>4 µg n=10</b>
<b>Media</b>	101.3	214.9	208.5	182.5
<b>DS</b>	65.7	100.5	88.37	131.1
<b>ES</b>	15.07	35.34	26.64	41.64
<b>Prueba de comparación múltiple de Dunnet</b>		Control vs 0.73 P < 0.05	Control vs 2 P < 0.05	Control vs 4 P > 0.05

\*En los renglones se muestran la media en segundos, la desviación estándar (DS), el error estándar (ES) y el valor de P para la prueba de comparación múltiple de Dunnet, en las columnas se ubican los grupos experimentales correspondientes.

### 7.2.2. Latencia de enterramiento.

Después de la administración intra-amigdalina de raclopride (0.73, 2 y 4  $\mu\text{g/lado}$ ), se observó una tendencia a que los animales disminuyeran la latencia para iniciar la conducta de enterramiento propiamente dicha, con respecto al grupo control (Figura 18). Sin embargo, dicho efecto fue solo observado con las dosis de 0.73 y 2  $\mu\text{g/lado}$  perdiéndose esta tendencia a dosis mayores (4  $\mu\text{g/lado}$ ). La tendencia referida resultó sin embargo no estadísticamente significativa (ANOVA:  $F_{(3, 44)} = 0.824$ ,  $P > 0.05$ ).



**Figura 18. Efecto de la micro-inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride en la latencia.** La administración intra-amigdalina de raclopride en el núcleo central de la amígdala produjo una tendencia a disminuir la latencia para iniciar la conducta de enterramiento del electrodo a dosis bajas e intermedias. Los resultados se expresan como medias con su respectivo error estándar. La presencia de diferencias significativas atribuible al tratamiento se investigó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ( $F_{(3, 44)} = 0.824$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ) (Control:  $n = 19$ ; raclopride: 0.73  $\mu\text{g/lado}$ :  $n = 8$ ; 2  $\mu\text{g/lado}$ :  $n = 11$ ; 4  $\mu\text{g/lado}$ :  $n = 10$ ).

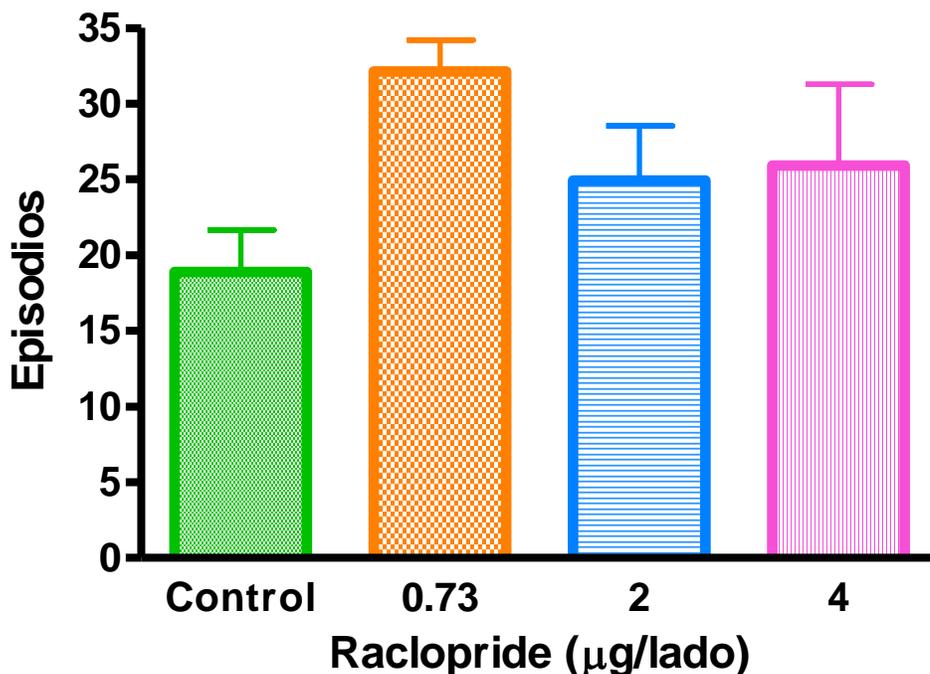
**Tabla 10. Análisis descriptivo de la latencia de enterramiento.\***

<b>Grupos</b>	<b>Control n =19</b>	<b>0.73 µg n=8</b>	<b>2 µg n=11</b>	<b>4 µg n=10</b>
<b>Media</b>	122.4	82.7	75.06	104.7
<b>DS</b>	94.92	52.41	65.54	111.7
<b>ES</b>	21.78	18.53	19.76	35.32
<b>Prueba de comparación múltiple de Dunnet</b>		Control vs 0.73 P > 0.05	Control vs 2 P > 0.05	Control vs 4 P > 0.05

\* En los renglones se muestran la media en segundos, la desviación estándar (DS), el error estándar (ES) y el valor de P para la prueba de comparación múltiple de Dunnet, en las columnas se ubican los grupos experimentales correspondientes.

### 7.2.3 Episodios de enterramiento.

En congruencia con el aumento del tiempo de enterramiento observado en los animales tratados con raclopride, el número de episodios de enterramiento observados durante la prueba incrementó con respecto al grupo control (Figura 19), observándose también dicho efecto desde la dosis más baja administrada y disminuyendo a dosis más altas. Sin embargo, los resultados muy probablemente debido a la gran variabilidad experimental encontrada no alcanzaron significancia estadística (ANOVA:  $F_{(3, 44)} = 2.157$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ). (Control:  $n = 19$ ; raclopride:  $0.73\mu\text{g/lado}$ :  $n=8$ ;  $2\mu\text{g/lado}$ :  $n=11$ ;  $4\mu\text{g/lado}$ :  $n=10$ ).



**Figura 19. Efecto de la micro-inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride en los episodios de enterramiento.** La administración de raclopride incremento el número de episodios de enterramiento a todas las dosis probadas. Sin embargo, muy probablemente debido a la gran variabilidad experimental encontrada el efecto no resultó estadísticamente significativo (ANOVA:  $F_{(3, 44)} = 2.157$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ). Los resultados se expresan como promedios con su respectivo error estándar (Control:  $n = 19$ ; raclopride:  $0.73\mu\text{g/lado}$ :  $n=8$ ;  $2\mu\text{g/lado}$ :  $n=11$ ;  $4\mu\text{g/lado}$ :  $n=10$ ).

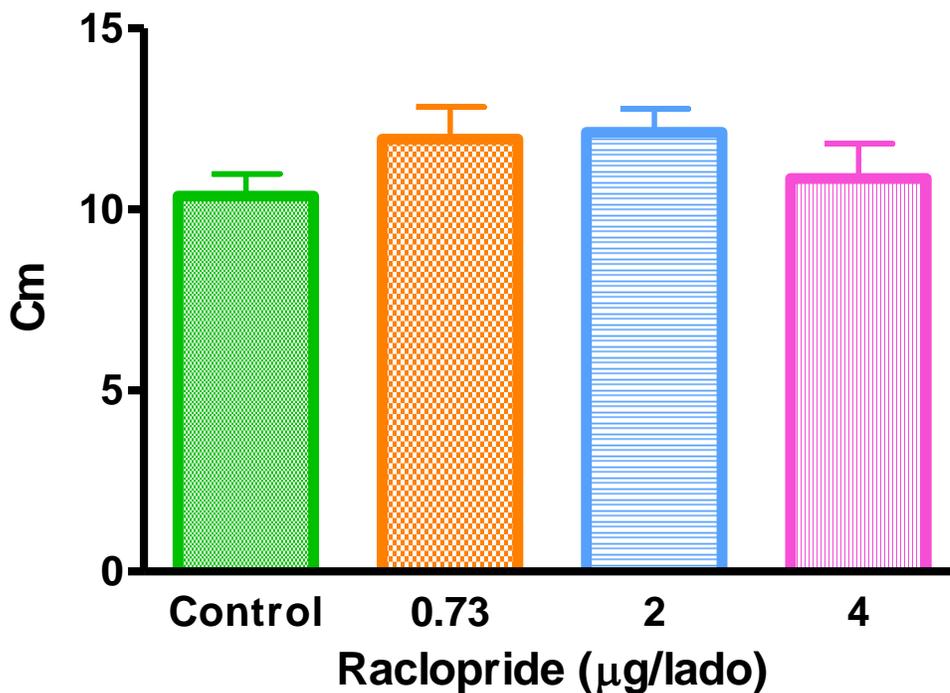
**Tabla 11.** *Análisis descriptivo de los episodios de enterramiento.* \*

<b>Grupos</b>	<b>Control n =19</b>	<b>0.73 µg n=8</b>	<b>2 µg n=11</b>	<b>4 µg n=10</b>
<b>Media</b>	18.89	32.13	24.91	28.50
<b>DS</b>	11.99	5.84	12.05	16.47
<b>ES</b>	2.75	2.06	3.63	5.20
<b>Prueba de comparación múltiple de Dunnet</b>		Control vs 0.73 P > 0.05	Control vs 2 P > 0.05	Control vs 4 P > 0.05

\* En los renglones se muestran la media, la desviación estándar (DS), el error estándar (ES) y el valor de P para la prueba de comparación múltiple de Dunnet, en las columnas se ubican los grupos experimentales correspondientes.

#### 7.2.4. Altura del aserrín.

La administración de raclopride (0.73, 2 y 4  $\mu\text{g/lado}$ ) dentro del núcleo central de la amígdala no afectó la altura que alcanzó el aserrín apilado en cercanía con el electrodo electrificado si se le compara con lo observado en el grupo control (ANOVA:  $F_{(3, 44)} = 1.360$ ,  $P > 0.05$ ;  $n = 48$ ). (Control:  $n = 19$ ; raclopride: 0.73 $\mu\text{g/lado}$ :  $n=8$ ; 2  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=11$ ; 4  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=10$ ).



**Figura 20. Efecto de la micro-inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride en la altura del aserrín.** La administración de raclopride dentro del núcleo central de la amígdala no produjo diferencias estadísticamente significativas en la altura alcanzada por el aserrín lanzado al electrodo electrificado usado en la prueba. Los resultados se expresan como medias con su respectivo error estándar. El análisis de varianza se analizó mediante una prueba de ANOVA de una vía ( $F_{(3, 44)} = 1.360$ ,  $P > 0.05$ ;  $n = 48$ ) (Control:  $n = 19$ ; raclopride: 0.73 $\mu\text{g/lado}$ :  $n=8$ ; 2  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=11$ ; 4  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=10$ ).

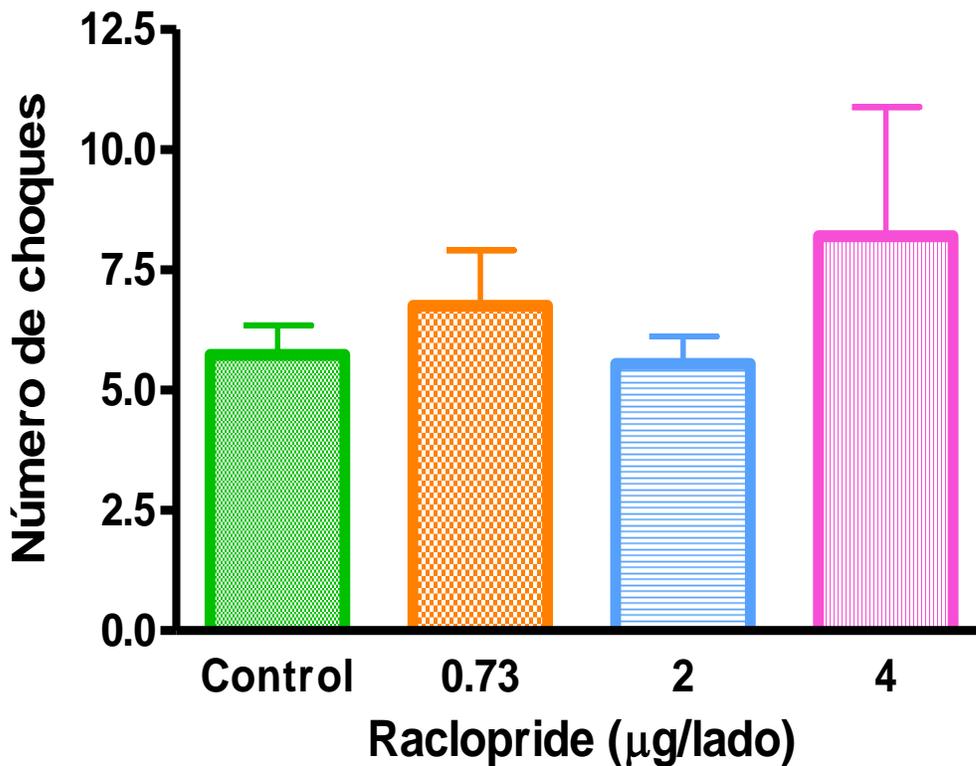
**Tabla 12.** *Análisis descriptivo de la altura de aserrín enterrado.*

<b>Grupos</b>	<b>Control n =19</b>	<b>0.73 µg n=8</b>	<b>2 µg n=11</b>	<b>4 µg n=10</b>
<b>Media</b>	10.37	11.94	12.14	10.85
<b>DS</b>	2.67	2.54	2.14	3.04
<b>ES</b>	0.61	0.89	0.64	0.96
<b>Prueba de comparación múltiple de Dunnet</b>		Control vs 0.73 P > 0.05	Control vs 2 P > 0.05	Control vs 4 P > 0.05

\* En los renglones se muestran la media en centímetros, la desviación estándar (DS), el error estándar (ES) y el valor de P para la prueba de comparación múltiple de Dunnet, en las columnas se ubican los grupos experimentales correspondientes.

### 7.2.5. Número de choques recibido

El número de choques recibido durante la prueba no se alteró de forma significativa por la micro-inyección intra-amigdalina de raclopride (0, 0.73, 2 y 4  $\mu\text{g/lado}$ ), (ANOVA:  $F_{(3, 44)} = 0.8183$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ). (Control:  $n = 19$ ; raclopride: 0.73 $\mu\text{g/lado}$ :  $n=8$ ; 2  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=11$ ; 4  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=10$ ).



**Figura 21. Efecto de la micro-inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride en el número de choques recibido.** La administración de raclopride dentro del núcleo central de la amígdala no afectó el número de choques que las ratas recibieron durante la prueba. Los resultados se expresan como medias con su respectivo error estándar. El análisis de varianza se analizó mediante una prueba de ANOVA de una vía ( $F_{(3, 44)} = 0.8183$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ). (Control:  $n = 19$ ; raclopride: 0.73 $\mu\text{g/lado}$ :  $n=8$ ; 2  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=11$ ; 4  $\mu\text{g/lado}$ :  $n=10$ ).

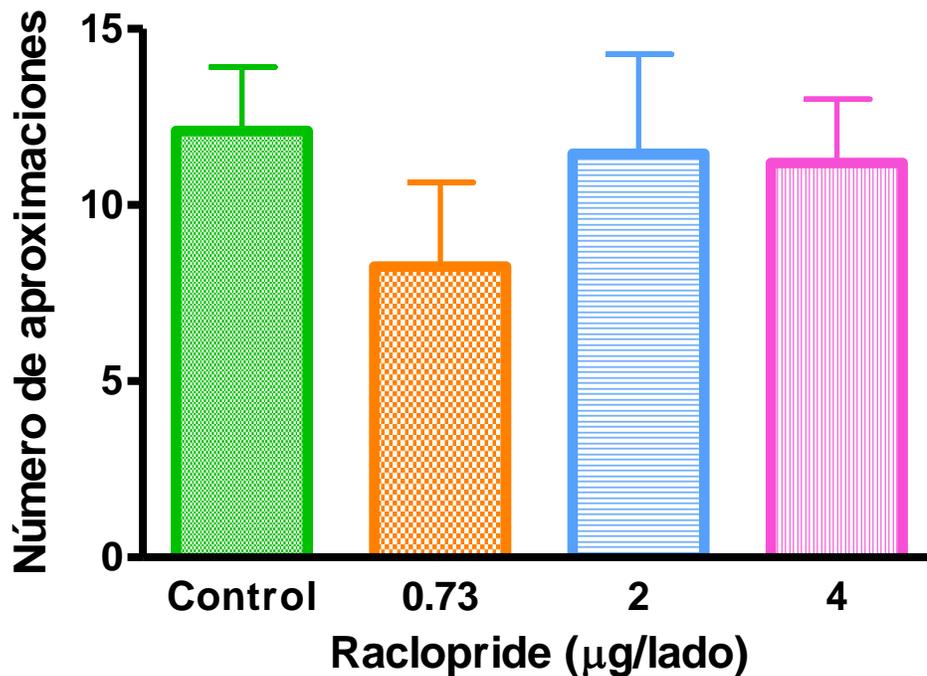
**Tabla 13.** *Análisis descriptivo del número de choques recibido.*

<b>Grupos</b>	<b>Control n =19</b>	<b>0.73 µg n=8</b>	<b>2 µg n=11</b>	<b>4 µg n=10</b>
<b>Media</b>	5.73	6.75	5.54	8.20
<b>DS</b>	2.68	3.28	1.91	8.49
<b>ES</b>	0.61	1.16	0.57	2.68
<b>Prueba de comparación múltiple de Dunnet</b>		Control vs 0.73 P > 0.05	Control vs 2 P > 0.05	Control vs 4 P > 0.05

\* En los renglones se muestran la media, la desviación estándar (DS), el error estándar (ES) y el valor de P para la prueba de comparación múltiple de Dunnet, en las columnas se ubican los grupos experimentales correspondientes.

### 7.2.6. Aproximaciones al electrodo

Como puede observarse en la Figura 22, el número de aproximaciones que las ratas tratadas con raclopride tuvieron al electrodo electrificado fue similar al observado en el grupo control. (ANOVA:  $F_{(3, 47)} = 0.4783$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ). (Control:  $n = 19$ ; raclopride:  $0.73\mu\text{g/lado}$ :  $n = 8$ ;  $2\mu\text{g/lado}$ :  $n = 11$ ;  $4\mu\text{g/lado}$ :  $n = 10$ ).



**Figura 22. Efecto de la micro-inyección bilateral intra-amigdalina de raclopride en las aproximaciones al electrodo.** *No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con respecto al grupo control. Los resultados se expresan como promedios con su respectivo error estándar. El análisis de varianza se analizó mediante una prueba de ANOVA de una vía ( $F_{(3, 47)} = 0.4783$ ,  $P > 0.05$ ,  $n = 48$ ) (Control:  $n = 19$ ; raclopride:  $0.73\mu\text{g/lado}$ :  $n = 8$ ;  $2\mu\text{g/lado}$ :  $n = 11$ ;  $4\mu\text{g/lado}$ :  $n = 10$ ).*

**Tabla 14.** *Análisis descriptivo de las aproximaciones al electrodo.*

<b>Grupos</b>	<b>Control n =19</b>	<b>0.73 µg n=8</b>	<b>2 µg n=11</b>	<b>4 µg n=10</b>
<b>Media</b>	12.11	8.25	11.45	11.20
<b>DS</b>	7.93	6.77	9.36	5.73
<b>ES</b>	1.81	2.39	2.82	1.821
<b>Prueba de comparación múltiple de Dunnet</b>		Control vs 0.73 P > 0.05	Control vs 2 P > 0.05	Control vs 4 P > 0.05

\* En los renglones se muestran la media, la desviación estándar (DS), el error estándar (ES) y el valor de P para la prueba de comparación múltiple de Dunnet, en las columnas se ubican los grupos experimentales correspondientes.

### 7.3. Evaluación motora en la prueba de campo abierto

El propósito general de someter a los animales a la prueba de campo abierto fue descartar la posibilidad de que los cambios observados en el enterramiento defensivo pudieran deberse a un efecto del raclopride sobre la actividad motriz de las ratas. En la prueba de campo abierto se midió como índice de locomoción horizontal el número de interrupciones (eventos) sufridos por un haz luminoso proyectado entre pares de celdas fotoeléctricas distribuidas uniformemente en el campo abierto. El número de levantamientos (locomoción vertical) y la distancia recorrida fueron también evaluados. Los resultados como se indica en la tabla 15 mostraron que ninguna de las dosis de raclopride administrada afectó de forma significativa alguno de estos parámetros.

**Tabla 9.** Efecto de la administración de raclopride en la locomoción de los animales en la prueba de campo abierto.\*

Medida conductual	Control n =19	0.73 µg n=8	2 µg n=11	4 µg n=10	ANOVA
Número de eventos	368.1 ± 94.21	389 ± 93.06	368.5 ± 50.68	383.7 ± 34.34	$F_{(3, 44)} = 0.116$ P = 0.83
Número de levantamientos	28.68 ± 14.59	24.13 ± 8.44	25.82 ± 9.98	26.90 ± 10.49	$F_{(3, 44)} = 0.3132$ P = 0.28
Distancia recorrida (m)	18.90 ± 3.97	19.20 ± 3.59	18.65 ± 2.35	19.46 ± 2.75	$F_{(3, 44)} = 0.211$ P = 0.81

\*Los valores reportados en la tabla están expresados como medias con sus respectivos errores estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía

## Capítulo 8

### Discusión

Los resultados del presente trabajo de tesis muestran que la administración bilateral intra-amigdalina de raclopride, un antagonista específico para los receptores  $D_2$  (Seeman y Van Tol, 1994), aumenta significativamente con respecto al control, el tiempo que las ratas pasan enterrando el electrodo electrificado que se encuentra presente en la caja utilizada en el modelo de miedo y ansiedad denominado “enterramiento defensivo” (Treit et al., 1994; DeBoer y Koolhaas, 2003). Dicho efecto se observa en la dosis más baja administrada ( $0.73 \mu\text{g/lado}$ ) y aunque el enterramiento persiste elevado deja de ser significativo en la dosis más alta ( $4 \mu\text{g/lado}$ ) muy probablemente debido a un aumento en la variabilidad experimental encontrada en este grupo. En consistencia con el aumento en el tiempo de enterramiento, también se observó una ligera tendencia, particularmente en la dosis de raclopride más baja con un mayor número de episodios de enterramiento, que muy probablemente por razones de la alta variabilidad encontrada en los otros grupos experimentales no resultó estadísticamente significativa en el análisis de varianza (ANOVA) practicado. Así mismo, la latencia a la que el animal iniciara la conducta de enterramiento propiamente dicha tras la recepción del primer choque eléctrico, que se considera un signo de reactividad, tendió a disminuir sin alcanzar validez estadística.

Dado que se ha observado que los roedores en su hábitat natural poseen la tendencia a enterrar objetos que pudieran potencialmente dañarlos o poner en riesgo su sobrevivencia (v.g. congéneres muertos, depredadores, objetos con sabores u olores aversivos, poco familiares o que recuerdan a un depredador) se ha considerado que esta conducta representa junto con la huida, la lucha o el congelamiento, una estrategia innata y filogenéticamente determinada encaminada a preservar su bienestar y existencia (Pinel y Treit, 1978; De Boer y Koolhas, 2003). El enterramiento practicado por el animal en esta prueba

representa entonces una conducta de enfrentamiento dirigida a preservar su integridad. Dicha interpretación encuentra apoyo en la disminución de esta conducta inducida por la administración de fármacos con perfil ansiolítico (Treit, 1990; Engin y Treit, 2008) y en su aumento por la administración de drogas con propiedades ansiogénicas (DeBoer y Koolhaas, 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, de acuerdo con lo anterior, indican que el bloqueo de los receptores D<sub>2</sub> cercanos al sitio de administración del raclopride en la amígdala, resulta en la producción de efectos ansiogénicos y que en consecuencia la activación de dichos receptores tiene en la rata un papel ansiolítico en la modulación del miedo y la ansiedad.

Aunque en algunos estudios se ha reportado una disminución de la actividad motora inducida por la administración sistémica de raclopride (Simón et al., 2000) o de otros neurolépticos (Jeste et al., 1998), la posibilidad de que el aumento en el tiempo de enterramiento observado en nuestros experimentos en donde el raclopride fue inyectado en la amígdala, fuera debida a sus efectos motores es poco probable, pues en lugar de una disminución en el tiempo de enterramiento se encontró un aumento de esta conducta. Más aún, los experimentos realizados en el campo abierto excluyen la presencia de efectos del raclopride sobre la actividad motora del animal, pues en esta prueba no se encontraron cambios en la locomoción horizontal y vertical cuando los grupos experimentales fueron comparados con el grupo control.

Es interesante señalar que no se observó algún efecto sobre el número de choques que el animal recibió, pues esta conducta ha sido considerada como una conducta de evitación pasiva que pretende alejar al animal de la fuente ambiental de peligro (Pinel y Treit, 1978; De Boer y Koolhaas, 2003). Dado que ante un peligro los animales responden con conductas de enfrentamiento tanto activas como pasivas que pretenden dominar la situación aversiva (Blanchard et al., 1993; Rodgers, 1997; DeBoer y Koolhaas, 2003) y los mecanismos que las

median podrían ser diferentes (Bandler et al., 1996; Keay and Bandler, 2001; DeBoer y Koolhaas, 2003), es posible que el raclopride haya afectado selectivamente sólo a uno de estos mecanismos o haya influido sobre la selección de las respuestas de enfrentamiento.

### *8.1. Comparación con datos de la literatura*

Existen pocos estudios que han evaluado la participación de los receptores dopaminérgicos  $D_2$  amigdalinos en la modulación del miedo y la ansiedad. Este estudio es el primero que explora el papel de estos receptores en un modelo de miedo y ansiedad no condicionado. Es interesante que los resultados obtenidos contrastan con los de Greba et al., (2001) y Guarraci et al. (2000) quienes estudiaron los efectos de la administración intra-amigdalina de los antagonistas  $D_2$ , raclopride y eticlopride respectivamente en los modelos condicionados de sobresalto potenciado por el miedo (Greba et al., 2001) y de congelamiento condicionado (Guarraci et al., 2000). Así, mientras que en nuestros experimentos la administración bilateral intra-amigdalina de raclopride indujo efectos ansiogénicos, caracterizados por un aumento en el tiempo de enterramiento, Greba et al (2001) encontraron una disminución en el sobresalto acústico potenciado por el miedo y Guarraci et al. (2001) una disminución en el congelamiento condicionado, conductas ambas que sugieren efectos ansiolíticos.

Aunque es difícil establecer comparaciones con resultados obtenidos de experimentos en que los antagonistas de los receptores  $D_2$  fueron inyectados en forma sistémica, es interesante señalar que utilizando modelos no condicionados como la caja luz-oscuridad (Timothy et al., 1999), el campo abierto (Siemiatowski et al., 2004) o la prueba de evitación de la luz (Reis et al., 2004), el bloqueo de los receptores  $D_2$  por la administración de raclopride (Timothy et al., 1999; Siemiatowski et al., 2004) o de sulpiride (Reis et al., 2004), otro antagonista selectivo de los receptores  $D_2$ , resultó como en nuestro caso en la producción de efectos ansiogénicos.

Una excepción a esto es la producción de efectos ansiolíticos por el sulpiride en el laberinto elevado en forma de "+", otro paradigma no condicionado (Rodgers et al., 1994). De igual modo en pruebas condicionadas, el bloqueo de los receptores  $D_2$  por el sulpiride (Reis et al., 2004) o el haloperidol (Inoue et al., 2005) produjo efectos ansiolíticos manifestados en los experimentos de Inoue et al. (2005) en una disminución del congelamiento condicionado, o por un abatimiento de las conductas de escape ante un estímulo aversivo en el trabajo de Reis et al. (2004). De manera similar, Ponnusamy et al. (2005) demostraron una facilitación de la extinción de la conducta de congelamiento condicionado en ratas tratadas con sulpiride. Dada la similitud de los efectos que resultan del bloqueo de los receptores  $D_2$  por la administración tanto sistémica como intra-amigdalina de antagonistas  $D_2$  en pruebas condicionadas, es posible sugerir que el sitio de acción de estos fármacos es la amígdala y que dependiendo del modelo utilizado (condicionado o no condicionado) y en consecuencia del tipo de miedo y ansiedad que éste genera, el bloqueo de los receptores  $D_2$  aumenta o disminuye la ansiedad.

### *8.2. Distribución de los receptores $D_2$ en la amígdala*

Como se indicó antes, los receptores  $D_1$  y  $D_2$  en la amígdala de la rata exhiben una distribución topográfica diferente, de acuerdo con la cual, no existe una sobreposición importante de ellos en los distintos núcleos amigdalinos. Así, a diferencia de la distribución de los receptores  $D_1$  que se encuentran preferentemente localizados en la isla intercalada principal y en las islas paracapsulares (Scibilia et al., 1992; Maltais et al., 2000; Mansour y Watson, 1995), en experimentos autorradiográficos (Bouthenet et al., 1987; Scibilia et al., 1992; Levey et al., 1993) en los que se usó el [125I] sulpiride como ligando, se demostró en la rata una alta densidad de receptores  $D_2$  en el núcleo central de la amígdala, que seguía un gradiente latero-medial y en donde la menor densidad de receptores se encontró en su parte medial (Scibilia et al., 1992). En congruencia

con estos resultados, experimentos inmunohistoquímicos realizados por Fuxe, 2009 (comunicación personal) localizaron en la amígdala a los receptores D<sub>2</sub> exclusivamente, dentro de una región muy discreta localizada en la interfase dorsal y lateral del núcleo central. Cabe señalar que en apoyo a lo encontrado por Fuxe, 2009 (comunicación personal) en el estudio de Scibilia et al. (1992) la densidad de receptores D<sub>2</sub> en el núcleo basolateral y las islas intercaladas paracapsulares fue muy baja. Inexplicablemente, Maltais et al (2000), mediante procedimientos inmunohistoquímicos mostraron una ubicación topográfica totalmente diferente a la señalada, en donde los receptores D<sub>2</sub> se localizaron en el núcleo basolateral casi exclusivamente.

Por otro lado, en la amígdala, mediante técnicas de hibridación in situ, se ha encontrado una concentración de alta a moderada de RNAm para receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub> (Fox et al., 1993), y más específicamente en sus núcleos basomedial, anterior, medial (Bouthenet et al., 1991) y central (Weiner et al., 1991; Mansour y Watson, 1995). Dado que el RNAm se expresa en somas y no en terminales, dichos hallazgos sugieren que los receptores D<sub>2</sub> encontrados en el núcleo central podrían corresponder a receptores postsinápticos localizados en interneuronas o neuronas de proyección o bien a hetero-receptores ubicados en las terminales axónicas de neuronas cuyos somas se localizan en regiones distintas al núcleo central, pues la posible existencia de autorreceptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> en la amígdala es discutible (Bull et al., 1991, Kilts et al., 1988; Margolis et al., 2008).

### *8.3. Sitio anatómico de la acción del raclopride dentro de la amígdala*

Estudios previos del laboratorio han demostrado que bajo las condiciones usadas en los experimentos de esta tesis, la difusión radial de compuestos inyectados en la amígdala con propiedades fisicoquímicas semejantes al raclopride es limitada, distribuyéndose dentro de un espacio ocupado por una esfera de 1 mm<sup>3</sup> con la punta de la cánula en su centro (Pérez de la Mora et al.,

2006) que representa la décima parte del volumen total de la amígdala. En vista de lo anterior, es razonable suponer que el raclopride inyectado haya actuado dentro de la amígdala en regiones cercanas al sitio de su inyección, en el núcleo central (CeA) y en áreas circunvecinas, bloqueando a los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, que de acuerdo a la información anatómica discutida anteriormente, se encuentran distribuidos selectivamente en la porción dorso-lateral de este núcleo amigdalino. Más aún, ya que esta región del CeA está ocupada por neuronas gabaérgicas que reciben aferentes tanto de la corteza cerebral (Sun y Cassel, 1993) como de sistemas nociceptivos espinales (Burstein y Potrebic, 1993; Gauriau y Bernard, 2002) formando una interfase inhibitoria con neuronas que proyectan a núcleos hipotalámicos y del tallo cerebral que participan en la respuesta de miedo y ansiedad (Sun y Cassel, 1993; Pérez de la Mora et al., 2008), es posible que los efectos ansiogénicos del raclopride reportados aquí se hayan ejercido bloqueando receptores D<sub>2</sub> presentes en las neuronas de esta interfase.

#### *8.4. Posibles mecanismos involucrados en los efectos de la administración intra-amigdalina del raclopride sobre el miedo y la ansiedad*

Aunque la explicación para los efectos ansiolíticos producidos por la administración intra-amigdalina de raclopride en el sobresalto potenciado por el miedo (Greba et al., 2001) y el congelamiento condicionado (Guarraci et al., 2000), y dado que así los efectos ansiogénicos observados en esta tesis tras la administración intra-amigdalina de este antagonista en la prueba del enterramiento defensivo no se conoce, es posible que estas divergencias involucren diferencias en la forma como la amígdala procesa la información que se genera tras la aplicación de los estímulos nociceptivos usados en cada tipo de prueba usada (condicionada o no condicionada) y en el papel que los receptores D<sub>2</sub> tienen en cada una de estas pruebas.

Ya que el mismo estímulo (dolor producido por un choque eléctrico) desencadena una conducta de enterramiento en el paradigma no condicionado del enterramiento defensivo y se comporta como un estímulo incondicionado en los modelos de congelamiento condicionado y sobresalto potenciado por el miedo, podría sugerirse que el estímulo nociceptivo aplicado en los modelos condicionados y los no condicionados sigue vías nerviosas distintas y afecta probablemente mecanismos diferentes. De esta manera, el dolor producido por el electrodo electrificado en la prueba del enterramiento defensivo llegaría al núcleo central directamente por la vía espino-braquio-amigdalóidea (Bernard y Besson, 1988; Burstein y Potrebic, 1993; Gauriau y Bernard, 2002) dando lugar a una respuesta incondicionada de tipo reflejo (Everitt et al., 2003) modulada localmente, mientras que la información nociceptiva producida por los choques eléctricos repetitivos dados a un animal durante el proceso de condicionamiento llegaría (ver apartado 3.2.3) al CeA después de haber sido procesada en el complejo basolateral en donde las asociaciones de los estímulos condicionados y no condicionados tienen lugar (Davis, 1992; LeDoux, 2000; Blair et al., 2001; Davis et al., 2003; Everitt et al., 2003, Pérez de la Mora et al., 2008). En apoyo a este planteamiento, se ha encontrado que el CeA participa en la modulación de la nocicepción (Neugebauer et al., 2009) y que su porción lateral contiene tanto el mayor porcentaje de aferentes “dolorosas” que llegan a este núcleo procedentes de la médula espinal (Bernard et al., 1988) como la densidad más grande de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> de la amígdala (Scibilia et al., 1992); Pérez de la Mora et al. (2009); Fuxe et al., 2009 (comunicación personal).

Así mismo, dado que se ha encontrado que la dopamina juega un papel importante en la modulación del dolor (Hagelberg et al., 2002; Wood et al., 2006; Coffeen et al., 2008) ejerciendo acciones antinociceptivas, es posible, en base a lo señalado anteriormente, que esta amina ejerza acciones moduladoras sobre la información nociceptiva que llega directamente al núcleo central de la amígdala procedente del núcleo braquial a través de la activación de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> localizados esencialmente en la porción lateral de este núcleo

(Fuxe et al., 2009, comunicación personal) o indirectamente a través del núcleo accumbens (Taylor et al., 2003) vía la activación de la vía meso-amigdalina (Phillips et al., 2003). Adicionalmente, ha sido demostrado por Bissière et al. (2003) que la dopamina a través de receptores  $D_2$  elimina la inhibición cortical ejercida en el núcleo lateral de la amígdala y favorece la instalación de potenciación a largo plazo en las aferencias talámicas que llevan información sensorial a este núcleo.

Es entonces concebible que el bloqueo de receptores  $D_2$  dentro del complejo basolateral de la amígdala impediría la desinhibición de grupos importantes de neuronas de esa localidad afectando muy probablemente los fenómenos plásticos que subyacen el proceso de asociación estímulo condicionado- no condicionado. Como consecuencia de esto, el estímulo condicionado sería ya incapaz de generar la respuesta condicionada correspondiente o de al menos de atenuarla, como ocurrió en los experimentos de Guarraci et al., (2000) y Greba et al., (2001). Por otro lado, también en base a lo señalado anteriormente, podría ser sugerido que el bloqueo de los receptores  $D_2$  amigdalinos por el raclopride a nivel de la porción lateral del núcleo central podría incrementar el enterramiento defensivo al suprimir el efecto antinociceptivo de la dopamina, incrementando de esta manera la aversividad del choque eléctrico recibido con el consecuente incremento en la conducta de enterramiento.

### *8.5. Limitaciones*

El miedo y la ansiedad son respuestas adaptativas de alta complejidad que se manifiestan a través de cambios somáticos, autónomos, endocrinos y conductuales. El estudio de estos fenómenos a través de un abordaje conductual y farmacológico como el usado en este trabajo resulta entonces a todas luces incompleto, pues sólo considera un aspecto de estos fenómenos. Adicionalmente, el estudio presentado en esta tesis se realizó utilizando una sola prueba conductual y no una batería de pruebas que pudieran haber explorado diversos

aspectos del miedo y la ansiedad, con lo que hubiera sido posible obtener conclusiones más firmes. Por otro lado, dada la relativa inespecificidad de algunas drogas usadas como herramientas de investigación, hubiera sido deseable comparar los efectos conductuales del raclopride con varios otros antagonistas  $D_2$ , así como estudiar el efecto de la administración previa o simultánea de agonistas para este mismo receptor, en un afán por establecer con certeza la especificidad de los efectos del raclopride en función del receptor dopaminérgico afectado. Adicionalmente, la dificultad para establecer líneas basales en modelos no condicionados de miedo y ansiedad incrementa la variabilidad experimental y obliga bajo condiciones ideales a contar con varias docenas de animales por grupo. Finalmente, habrá que mencionar como otra limitación importante de este estudio, los aspectos relacionados con la difusión intra-amigdalina del raclopride que impide limitar sus efectos a una región menor al ocupado por el volumen de una esfera de  $1 \text{ mm}^3$  y a la necesidad, en aras de obtener resultados más reproducibles y confiables, de haber considerado en el análisis estadístico sólo aquellos animales con cánulas implantadas bilateralmente en lugares idénticos de la amígdala.

#### *8.6. Perspectivas*

Los resultados mostrados en este trabajo abren una brecha hacia nuevas interrogantes, ya que, una vez que se conocen los efectos conductuales que resultan del bloqueo de receptores  $D_2$  amigdalinos, sería relevante conocer como interaccionan éstos con los receptores  $D_1$  presentes en el núcleo basolateral (BLA) y en las islas intercaladas paracapsulares para entender cabalmente el papel de los sistemas dopaminérgicos en la modulación del miedo y la ansiedad. De igual forma, sería importante conocer la interacción que tienen los receptores  $D_2$  con los sistemas de neurotransmisión gabaérgico y glutamatérgico amigdalinos a cuyo cargo corre la modulación global del miedo y la ansiedad.

Para el futuro, con objeto de entender el papel que juegan los receptores dopaminérgicos (incluidos los D<sub>2</sub>) en el miedo y la ansiedad así como en su plasticidad asociada, se recomienda usar técnicas de imagenología tipo c-fos y c-jun que permitan visualizar al microscopio los núcleos activados tras la interacción de agonistas o antagonistas con los receptores D<sub>2</sub> o la interacción de los receptores D<sub>2</sub> con otros receptores dopaminérgicos a nivel membranar mediante la técnica de Förster Resonance Energy Transfer (FRET). Asimismo, enfoques neuroquímico- conductuales que permitan investigar las ventajas que un determinado mecanismo asociado a la transmisión dopaminérgica mediada por receptores D<sub>2</sub> confieren a distintos aspectos de la modulación de la ansiedad deben de ser usados. Tales enfoques incluyen la exploración de cambios inducidos en modelos de ansiedad sobre la cascada de transducción utilizada por los receptores D<sub>2</sub> y su interacción con cascadas usadas por los receptores con los que los receptores D<sub>2</sub> interaccionan. Finalmente, el uso de ratones knock-outs regionales e inducibles en forma condicional, arrojarán resultados importantes en relación al papel de los receptores D<sub>2</sub> en la modulación del miedo y la ansiedad.

## Capítulo 9

### Conclusión

Los resultados de este trabajo apoyan la noción de que el miedo y la ansiedad son mecanismos naturales de afrontamiento que aparecen cuando la homeostasis del individuo se ve amenazada por un peligro real o potencial, dando como resultado una serie de manifestaciones subjetivas, autónomas, endócrinas, musculares y conductuales destinadas a preparar al sujeto a encarar la situación que lo amenaza. Existe acuerdo en que la amígdala juega un papel primordial en la modulación del miedo y la ansiedad, y de que en ella se pueden generar respuestas ansiogénicas tanto a estímulos que llegan directamente del tálamo, como a estímulos que la alcanzan después de ser procesados en la corteza cerebral. En los roedores, el enterramiento representa una conducta innata que los “defiende” de objetos o situaciones que ponen en riesgo su sobrevivencia.

La vía dopaminérgica mesolímbica proyecta del área tegmental ventral y la sustancia nigra hacia a la amígdala, en donde la dopamina liberada ejerce sus acciones estimulado tanto a receptores  $D_1$  como  $D_2$ . En este trabajo de tesis se observó que en la prueba de enterramiento defensivo la administración bilateral intra-amigdalina del raclopride, un antagonista específico para los receptores  $D_2$ , aumentó significativamente el tiempo de enterramiento y provocó una tendencia al incremento en el número de episodios de esta conducta como a la disminución en su latencia. Dichos hallazgos, tomados en su conjunto permiten concluir que el bloqueo de los receptores  $D_2$  amigdalinos, al menos en esta prueba, posee efectos ansiogénicos.

Estos resultados, contrastan con los obtenidos por otros grupos, quienes usando modelos condicionados de miedo y ansiedad observaron, bajo condiciones de tratamiento similares a las nuestras, efectos ansiolíticos. Si embargo, dado que los receptores  $D_2$  amigdalinos, participan tanto en el condicionamiento al miedo como en la modulación de las respuestas al dolor mediadas directamente por la

actividad del núcleo central, como respuesta a estímulos que la alcanzan directamente vía el tálamo, se sugiere, que los efectos ansiogénicos observados pudieran involucrar cambios defensivos de tipo reflejo, mediados por estímulos llegados a la amígdala directamente por esta vía y con poca participación de la corteza, como ocurriría con estímulos mas complejos que involucran cierto grado de aprendizaje o de elección de alternativas.

## Glosario

- **8-OH-DPAT** → Agonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>
- **AB** → Región basal accesoria de la amígdala
- **ACTH** → La hormona adrenocorticotropa o corticotropina es una hormona polipeptídica producida por la hipófisis y que estimula a las glándulas suprarrenales, quienes a su vez secretarán a los glucocorticoides.
- **Agonista** → Es una sustancia que tiene alta afinidad por un receptor y que produce una actividad intrínseca similar a la del ligando endógeno.
- **Ansiogénico** → Sustancia que aumenta los parámetros del miedo y la ansiedad.
- **Ansiolítico** → Sustancia que disminuye los parámetros del miedo y la ansiedad.
- **Antagonista** → Sustancia que tiene alta afinidad por un receptor, pero que al unirse a él no produce algún tipo de actividad intrínseca celular, bloqueando el sitio de unión y la respuesta correspondiente.
- **Agonista inverso** → Es una sustancia que tiene alta afinidad por un receptor, pero que producirá una actividad intrínseca opuesta a la de un agonista completo.
- **Alopregnanolona** → Neuroesteroide modulador del receptor GABA<sub>A</sub>. Tiene efectos ansiolíticos.
- **AMPc** → Adenosin monofosfato cíclico. Segundo mensajero sintetizado por la proteína de membrana adenilato ciclasa a partir del ATP. Tiene numerosos efectos, entre ellos activar a la proteína cinasa A (PKA).
- **Apomorfina** → Agonista dopaminérgico con afinidad por los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>
- **ATP** → Adenosin trifosfato. Molécula que almacena y transfiere energía.
- **ATV** → Área tegmental ventral. Localizada en la línea media de la base del mesencéfalo.
- **B** → Núcleo basal de la amígdala

- **Benzodiacepina** → Agonista de receptores GABA<sub>A</sub> que tiene efectos ansiolíticos, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sedantes e hipnóticos.
- **BLA** → Núcleo basolateral de la amígdala.
- **Buspirona** → Agonista parcial del receptor 5-HT<sub>1A</sub>.
- **CA1, CA2 y CA3** → El hipocampo es una estructura localizada en el lóbulo temporal del encéfalo. Se compone de las regiones giro dentado, corteza entorrinal y las áreas CA (Cornus Ammonis) que son CA1, CA2 y CA3.
- **CaMK-II** → Proteína cinasa dependiente del calcio y calmodulina tipo II. Es una proteína que forma parte de una cascada de señalización específica. Es activada por el complejo calcio-calmodulina y su función es fosforilar otras proteínas.
- **CCK-4** → Tetrapéptido derivado del neuropéptido colecistoquinina con efectos ansiogénicos.
- **CCK-8S** → Molécula de ocho péptidos derivada del neuropéptido colecistoquinina con efectos ansiogénicos.
- **CeA** → Núcleo central de la amígdala.
- **Clordiazepóxido** → Agonista de receptores GABA<sub>A</sub> que tiene efectos ansiolíticos, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sedantes e hipnóticos.
- **COMT** → Catecol-O-metil transferasa. Enzima degradadora de la dopamina.
- **CREB** → Factor de transcripción del DNA. Modifica la expresión de los genes que serán transcritos para obtener un efecto específico.
- **DARPP-32** → Proteína dependiente de dopamina y AMPc reguladora de la fosfatasa 1, de 32 kilodaltons.
- **DMCM** → Agonista inverso de los receptores GABA<sub>A</sub>, tiene efectos ansiogénicos.
- **DOPAC** → Metabolito de la dopamina, es el resultado de la acción de la COMT.
- **EMD-68843** → Agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e inhibidor de la recaptura de la serotonina.

- **Eticlopride** → Antagonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>.
- **Fluoxetina** → Fármaco inhibidor de la recaptura de la serotonina con propiedades antidepresivas.
- **GABA** → Ácido gamma-amino-butírico. Inhibidor del sistema nervioso por excelencia.
- **HVA** → Ácido homovanílico. Metabolito de la dopamina, resultado de la acción de la enzima mono-amino-oxidasa (MAO).
- **I o lpm** → Islas paracapsulares intercaladas de la amígdala.
- **IM** → Isla paracapsular principal.
- **Ipsapirona** → Agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>.
- **LA** → Núcleo lateral de la amígdala.
- **L-dihidroifenilalanina (L-DOPA)** → En la vía de síntesis de dopamina, la L-DOPA es el sustrato que dará lugar a la dopamina por acción de la enzima aminoácido descarboxilasa.
- **MAO** → Enzima mono-amino-oxidasa. Degrada a la dopamina en metabolitos.
- **MAPK** → Proteína cinasa promotora del mitogen. Proteína que forma parte de una cascada de señalización específica. Su función es fosforilar a otras proteínas.
- **Midazolam** → Agonista de receptores GABA<sub>A</sub> que tiene efectos ansiolíticos, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sedantes e hipnóticos.
- **MPEP** → Antagonista de mGluR5.
- **Muscimol** → Agonista de receptores GABA<sub>A</sub> que tiene efectos ansiolíticos, anticonvulsivantes, relajantes musculares, sedantes e hipnóticos.
- **NPY** → Neuropeptido Y.
- **PKA** → Proteína cinasa A. Proteína que forma parte de una cascada de señalización específica. Es activada por el AMPc y su función es fosforilar a otras proteínas.

- **PKC** → Proteína cinasa C. Proteína que forma parte de una cascada de señalización específica. Es activada por el diacilglicerol y su función es fosforilar a otras proteínas.
- **Pregnanolona** → Neuroesteroide modulador del receptor GABA<sub>A</sub>. Tiene efectos ansiolíticos.
- **Quinpirole** → Agonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>.
- **Raclopride** → Antagonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>.
- **Receptores AMPA** → Receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópicos.
- **Receptores NMDA** → Receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópicos.
- **RNA<sub>m</sub>** → Acido ribonucleico mensajero. En la fase de transcripción del DNA. La enzima RNA polimerasa transcribe el RNA<sub>m</sub>, a partir del cual los ribosomas traducirán y sintetizarán una proteína.
- **SCH 23390** → Antagonista de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub>.
- **SKF 38393** → Agonista de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub>.
- **Stressin1-A** → Péptido agonista del receptor del factor de liberación de corticotropina.
- **Sulpiride** → Antagonista de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>.
- **VIP** → Neuropeptido intestinal vasoactivo.

## Referencias

- Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harvard Review of Psychiatry*, (12) 6, 305 – 320.
- Aguilar, M. A., Miñarro, J., Pérez-Iranzo, N. y Simón, V.M. (1994). Behavioral profile of raclopride in agonistic encounters between male mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 47(3), 753-756.
- Akirav, I., Raizel, H. y Maroun, M. (2006). Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA<sub>A</sub> agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 23(3), 758-764.
- Anden, N. E., Carlsson, A., Dahlström, A., Fuxe, K., Hillarp, N.-Å, y Larsson, K. (1964). Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.*, 3, 523-30.
- Antoniadis, E. A., Winslow, J. T., Davis, M. y Amaral, D. G. (2007). Role of the primate amygdala in fear-potentiated startle: effects of chronic lesions in the rhesus monkey, *The Journal of Neuroscience*, 27 (28), 7386-7396.
- Arias-Montaño, J. A. y García-Hernández V. (2001). Los premios Nobel en ciencias 2000: Fisiología y Medicina. Arvid Carlsson, Paul Greengard y Eric Kandel. *Avance y perspectiva*, 20, 31-36.
- Asan, E. (1997). Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell & Tissue Research*, 288, 449-469.
- Bartoszyk, G. D. (1998). Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. Involvement of dopamine autoreceptors. *Life Sciences*, (62) 7, 649-663.
- Bandler, R., Price, J. L. y Keay, K. 1996. Brain mediation of active and passive emotional coping. *Prog.Brain.Res.* 107, 285-300.
- Bauer, E. P., Schafe, G. E. y LeDoux, J. E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience.*, 22(12), 5239-5249.
- Belzung, C. y Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural Brain Research*, 125, 141-149.
- Benelli, A., De Pol, A., Poggioli, R., Cavazzuti, E., Arletti, R., Bertolini, A. y Vergoni, V. (2000). L-Sulpiride, at antidepressant dosage prevents conditioned-fear stress-induced gastric lesions in rats. *Pharmacological Research*, 42 (2), 157-160.
- Bernard, J. F. y Besson, J. M. 1988. Convergence of nociceptive information on the parabrachio-amygdala neurons in the rat. *C. R. Acad. Sci. III.* 307, 841-847.

- Biedenkapp, J. C. y Rudy, J. W. (2008). Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: role of ventral subiculum and amygdala. *Learning and Memory*, 16 (1), 38-45.
- Birnbaum, S. G. y Davis, M. (1998). Modulation of the acoustic startle reflex by infusion of corticotrophin-releasing hormone into the nucleus reticularis pontis caudalis. *Brain. Res.*, 782 (1-2), 318-323.
- Bissiere, S., Humeau, Y. y Luthi, A. (2003). Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nature Neurosci.*, 6, 587–592.
- Bitran, D., Dugan, M., Renda, P., Ellis, R. y Foley, M. (1999). Anxiolytic effects of the neuroactive steroid pregnanolone (3 alpha-OH-5 beta-pregnan-20-one) after microinjection in the dorsal hippocampus and lateral septum. *Brain Research*, 850(1-2), 217-24.
- Blair, H. T., Schafe, G. E., Bauer, E. P., Rodrigues, S. M. y LeDoux, J. E. (2001). Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learning and memory*, 8(5), 229-242.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Rodgers, R. J. y Blanchard, D. C. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav. Brain. Res.*, 58, 155–165.
- Blundon, J. A. y Zakharenko, S. S. (2008). Dissecting the components of long-term potentiation. *Neuroscientist*, 14 (6), 598-608.
- Boccia, M. M., Blake, M. G., Baratti, C. M. y McGaugh, J. L. (2009). Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiol.Learn.Mem.*, 91(1), 93-97.
- Bonci, A y Hopf, W. (2005). The dopamine D<sub>2</sub> receptor: New surprises from an old friend. *Neuron*, 47, 335-338.
- Bondi, C. O., Barrera, G., Lapid, M. D., Bedard, T., Mahan, A. y Morilak, D. A. (2007). Noradrenergic facilitation of shock-probe defensive burying in lateral septum of rats, and modulation by chronic treatment with desipramine. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry.*, 31(2), 482-495.
- Bouthenet, M. L., Souil, E., Martres, M. P., Sokoloff, P., Giros, B. y Schwartz, J. C. (1991). Localization of dopamine D<sub>3</sub> receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D<sub>2</sub> receptor mRNA. *Brain. Res.*, 564(2), 203-219.
- Braga, M. F., Aronjadou-Anderjaska, V. y Li, H. (2004). The physiological role of kainate receptors in the amygdala. *Mol. Neurobiol.*, 30 (2), 127-141.
- Brennan, A. R. y Arnsten, A. F. T. (2008). Neuronal mechanisms underlying attention deficit hyperactivity disorder. The influence of arousal on prefrontal cortical function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1129, 236-245.

- Brock, J. W., Farooqui, S., Ross, K. y Prasad, C. (1992). Localization of dopamine D<sub>2</sub> receptor protein in rat brain using polyclonal antibody. *Brain. Res.*, 578, 244-250.
- Büchel, C., Morris, J., Dolan, R. J. y Friston, K. J. (1998). Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study. *Neuron*, 20(5), 947-57.
- Bull, D. R., Bakhtiar, R. y Sheehan, M. J. (1991). Characterization of dopamine autoreceptors in the amygdala: a fast cyclic voltammetric study in vitro. *Neuroscience Letters*, 134 (1), 41-44.
- Burstein, R. y Potrebic, S., (1993). Retrograde labeling of neurons in the spinal cord that project directly to the amygdala or the orbital cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 335, 469–485.
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J. y Everitt, B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amígdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26, 321-352.
- Carobrez, A. P. y Bertoglio, L. J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 1193-1205.
- Carvalho, M. C., Albrechet-Souza, L., Masson, S. y Brandao, M. L. (2005). Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1857-1866.
- Carrive, P. (2000). Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. *Brain Research*, 858, 440-445.
- Coffeen, U., López-Avila, A., Ortega-Legaspi, J. M., del Angel, R., López-Muñoz, F.J. y Pellicer, F. 2008. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate longterm nociception in the rat. *European Journal of Pain*, 12, 535-543.
- Conn, P. J., Tamminga, C., Schoepp, D. D. y Lindsley, C. (2008). Schizophrenia: moving beyond monoamine antagonists. *Molecular Interventions*, 8(2), 99-107.
- Contreras, C. M., Rodríguez-Landa, J. F., Gutiérrez-García, A. G., Bernal Morales, B. y Saavedra, M. (2003). El estudio experimental de la ansiedad y la depresión. *Ciencia*, 54, 29-39.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. (1996). Dopamine. En: Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H., *The biochemical basis of neuropharmacology*. (Sexta edición). New York, E.U.A: Oxford University Press (pp. 200-233).
- Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H. (2003). Dopamine. En: Cooper, J. R., Bloom, F. E. y Roth, R. H., *The biochemical basis of neuropharmacology*. (Octava edición). New York, E.U.A: Oxford University Press (pp. 225-270).

- Cortese, B. M. y Phan, K. L. (2005). The role of glutamate in anxiety and related disorders. *CNS Spectr.*, 10 (10), 820-830.
- Charney, D. S. (2003). Neuroanatomical circuits modulating fear and anxiety behaviors. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 108 (Suppl. 217), 38-50.
- Dalgleish, T. (2004). The emotional brain. *Nature Reviews*, 5, 582-589.
- Dampney, R. A., Horiuchi, J. y McDowall, L. M. (2008). Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behavior. *Auton. Neurosci.*, 142 (1-2), 3-10.
- Damsa, C., Kosel, M. y Moussally, J. (2009). Current status of brain imaging in anxiety disorders. *Curr. Opin. Psychiatry*, 22 (1), 96-110.
- Davidson, R. J. e Irwin, W. (1999). The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends. Cogn. Sci.*, 3 (1), 11-21.
- Davidson, R. J. (2003). Darwin and the Neural Bases of Emotion and Affective Style, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1000: 316–336.
- Davis, M. (1992). The role of the amygdala in conditioned fear. En: Aggleton, J.P. (Ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory and Mental Dysfunction*. Nueva York: Wiley-Liss, Inc (pp. 255-305).
- Davis, M. y Whalen, P. J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion, *Molecular Psychiatry*, 6, 13-34.
- Davis, M., Walker, D. L. y Myers, K. M., (2003). Role of the amygdala in fear extinction measured with potentiated startle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 985, 218-232.
- Debiec, J. y LeDoux, J. (2004). Fear and the brain. *Social Research*, 71 (4), 807-818.
- De Boer, S. F. y Koolhaas, J. M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 463, 145-161.
- Defagot, M. C., Malchiodi, E. L., Villar, M. J. y Antonelli, M. C. (1997). Distribution of D<sub>4</sub> dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.*, 45 (1), 1-12.
- Degroot, A., Kashluba, S. y Treit, D. (2001). Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 69(3-4), 391-399.
- Degroot, A. y Treit, D. (2003). Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience*, 117(2), 493-495
- Degroot, A. y Treit D. (2004). Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. *Brain Research*, 1001(1-2), 60-71.
- Degroot, A. y Nomikos, G.G. (2005). Fluoxetine disrupts the integration of anxiety and aversive memories. *Neuropsychopharmacology*, 2, 391-400.

- De Oliveira, A. R., Reimer, A. E. y Brandao, M. L. (2006). Dopamine D<sub>2</sub> receptor mechanisms in the expression of conditioned fear. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 84, 102-111.
- De Olmos, J. S., Beltramino, C. A. y Alheid, G. (2004). Amygdala and extended amygdala of the rat: A citoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey. En Paxinos, G. y Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Londres: Academic.
- DiMicco, J. A., Stotz-Potter, E. H., Monroe, A. J. y Morin, S. M. (1996). Role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiovascular response to stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 23 (2), 171-176.
- DiMicco, J. A., Samuels, B. C., Zaretskaia, M. V. y Zaretsky, D. V. (2002). The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71 (3), 469-480.
- Dringenberg, H. C., Levine, Y. y Menard, J. L. (2008). Electrical stimulation of dorsal, but not ventral hippocampus reduces behavioral defense in the elevated plus maze and shock-probe burying test in rats. *Behavioral Brain Research*, 186(1), 143-147.
- Ebner, K., Muigg, P., Singelwald, G. y Singelwald, N. (2008). Substance P in stress and anxiety: NK-1 receptor antagonism interacts with key brain areas of the stress circuitry. *Ann. N. Y. Acad. Scien.*, 1144, 61-73.
- Engin, E. y Treit, D. (2007). The anxiolytic-like effects of allopregnanolone vary as a function of intracerebral microinfusion site: the amygdala, medial prefrontal cortex, or hippocampus. *Behavioural Pharmacology*, 18(5-6), 461-470.
- Engin, E. y Treit, D. (2008). The effects of intra-cerebral drug infusions on animals unconditioned fear reactions: a systematic review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, 32 (6), 1399-1419.
- Everitt, B. J., Cardinal, R. N., Parkinson, J. A. y Robbins, T. W., (2003). Appetitive behavior. Impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985, 233-250.
- Fahn, S. (2008). The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, (23)3, 497-508.
- Fallon, J. H. y Loughlin, S. E., (1995). Substantia nigra. En Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System. Vol. I. Forebrain and midbrain*, (2a edición) Sydney, Australia: Academic Press (215-237).
- Farb, C. R., Aoki, C. y LeDoux, J. E. (1995). Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: a light and electron microscopy study. *Journal. Comp. Neurol.*, 362 (1), 86-108.
- Fauman, M. (2003). *DSM-IV-TR, Guía de estudio*. Barcelona: Masson.
- Fendt, M., Koch, M., y Schnitzler, H. (1996). Somatostatin in the Pontine Reticular Formation modulates fear potentiation of the acoustic startle response. An

- anatomical, electrophysiological and behavioral study, *The Journal of Neuroscience*, 16 (9), 3097-3103.
- Fendt, M. (2001). Injections of the NMDA receptor antagonist aminophosphonopentanoic acid into the lateral nucleus of the amygdala block the expression of fear-potentiated startle and freezing. *The Journal of Neuroscience*, 21(11), 4111-4115.
- Fernández-Guasti, A. y López-Ruvalcaba, C. (2004). Farmacología conductual. En Corsi-Cabrera, M. (comp.), *Aproximaciones de las neurociencias a la conducta*. (2ª edic) México: Manual Moderno (209-228).
- File, S. E. y Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, 463, 35-53.
- Flórez, J. (1997). Acciones de los fármacos II. Mecanismos moleculares, en Flórez, J., Armijo, J. A. y Mediavilla, A. (Dir.), *Farmacología Humana*. (3ª edición). México: Masson.
- Forsay, M. I. y Gysling, K. (2004). Role of the noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain. Res. Rev.*, 47 (1-3), 125-160.
- Fox, C. A., Mansour, A., Thompson, R. C., Bunzow, J. R., Civelli, O. y Watson Jr., S. J. (1993). The distribution of dopamine D<sub>2</sub> receptor heteronuclear RNA (hnRNA) in the rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6, 363-373.
- Fuxe, K., Hökfelt, T., Ungerstedt, U. (1970). Morphological and functional aspects of central monoamine neurons. *Int. Rev. Neurobiol.*, 13, 93-126.
- Fuxe, K., Jacobsen, K. X., Hökfelt, M., Tinner, B., Jansson, A., Staines, W. A. y Agnati, L. F. (2003). The dopamine D<sub>1</sub> receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: relationship to the dopamine innervations. *Neuroscience*, 119(3), 733-746.
- Gauriau, C. y Bernard, J.-F., 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* 87, 251–258.
- Gallego, J., Nsegbe, E. y Durand, E. (2001). Learning in respiratory control. *Behav. Modif.*, 25 (4), 495-512.
- Garakani, A., Mathew. S. J. y Charney., D. S. (2006). Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 73 (7), 941-949.
- Gardner, E. L. y Ashby, C. R. Jr. (2000). Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24(1), 115-118.
- Gil, J. M. y Rego, A. C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2803-2820.
- Goldstein, L. E., Rasmusson, A. M., Bunney B. S. y Roth, R. H. (1996). Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and

- prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat, *Journal of Neuroscience*, 16, 4787-4798.
- Gómez, C., Sáldivar González, J. A. y Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica, *Salud Mental*, 1 (25), 14-24.
- Greba, Q., Gifkins, A. y Kokkinnidis, L. (2001). Inhibition of amygdaloid dopamine D<sub>2</sub> receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle, *Brain Research*, 899, 218-226.
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of dopamine signaling. *Bioscience Reports*, 21 (3), 247-269.
- Groenink, L., Van der Gugten, J., Compaan, J. C., Maes, R. A. y Olivier, B. (1997). Flesinoxan pretreatment differentially affects corticosterone, prolactin and behavioural responses to a flesinoxan challenge. *Psychopharmacology (Berl.)*, 131(1), 93-100.
- Guarraci, F. A., Frohardt, R. J. y Kapp, B. S. (1999). Amygdaloid D<sub>1</sub> dopamine receptor involvement in pavlovian fear conditioning. *Brain Research*, 827, 28-40.
- Guarraci, F. A., Frohardt, R. J., Falls, W. A. y Kapp, B. S. (2000). The effects of intra-amygdaloid infusions of a D<sub>2</sub> dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 3 (114), 647-651.
- Gurevich, E. V. y Joyce, J. N. (1999). Distribution of dopamine D<sub>3</sub> receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D<sub>2</sub> receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology*, 20, 60-80.
- Gutman, A. R., Yang, Y., Ressler, K. J. y Davis, M. (2008). The role of neuropeptide Y in the expression and extinction of fear-potentiated startle. *The Journal of Neuroscience*, 28 (48), 12682-12690.
- Guyton, A. C. y Hall, J. E. (2001). *Tratado de fisiología médica*. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hagelberg, N., Martikainen, I. K., Mansikka, H., Hinkka, S., Nagren, K., Hietala, J., Scheinin, H. y Pertovaara, A. 2002. Dopamine D<sub>2</sub> receptor binding in the human brain is associated with the response to painful stimulation and pain modulatory capacity. *Pain*, 99, 273-279.
- Hakvoort Schwerdtfeger, R.M. y Menard, J.L. (2008). The lateral hypothalamus and anterior hypothalamic nucleus differentially contribute to rats defensive responses in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Physiology and Behavior*, 93(4-5), 697-705.
- Heinze, G. (2003). La ansiedad: cómo se la concibe actualmente. *Ciencia*, 54, 8-15.
- Humeau, Y., Reisel, D., Johnson, A. W., Borchardt, T., Jensen, V., Gebhardt, C., Bosch, V., Bannerman, D. M., Good, M. A., Hvalby, O., Sprengel, R. y Lüthi, A. (2007). A pathway-specific function for different AMPA receptor subunits

- in amygdale long-term potentiation and fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 27 (41), 10947-10956.
- Inoue, T., Izumi, T., Li, X.B., Kitaichi, Y., Nakagawa, S y Koyama, T. (2005). Effect of dopamine D<sub>1/5</sub> receptor antagonist on haloperidol-induced inhibition of the acquisition of conditioned fear. *European Journal of Pharmacology*, 519, 253-258.
- Iversen, S. D. e Iversen, L. L. (2006). Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neuroscience*. 5 (30), 188-193.
- Jasnow, A. M. y Huhman, K. L. (2001). Activation of GABA<sub>(A)</sub> receptors in the amygdale blocks the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. *Brain Res*, 920 (1-2), 142-150.
- Jasnow, A. M., Cooper, M. A. y Huhman, K. L. (2004). N-methyl-D-aspartate receptors in the amygdala are necessary for the acquisition and expression of conditioned defeat. *Neuroscience*, 123(3), 625-634.
- Jeste, D. V., Lohr, J. B., Eastham, J. H., Rockwell, E. y Caligiuri, M. P. (1998). Adverse neurobiological effects of long-term use of neuroleptics: human and animal studies. *Journal of Psychiatric Research*, 32, 201-214.
- Jucaite, A. (2002). Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. *Medicina*, 38(4), 357-362.
- Kalin, N. H., Shelton, S. E., Davidson, R. J. y Kelley, A. E. (2001). The primate amygdala mediates acute fear but not the behavioral and physiological components of anxious temperament. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), 2067-2074.
- Kalin, N. H., Shelton, S. E. y Davidson, R. J. (2004). The role of the central nucleus of the amygdala in the mediating fear and anxiety in the primate. *The Journal of Neuroscience*, 24(24), 5506-5515.
- Kalueff, A. V. y Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 64, 439-448.
- Kamei, H., Kameyama, T. y Nabeshima, T. (1995). Activation of both dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors necessary for amelioration of conditioned fear stress. *European Journal of Pharmacology*, 273, 229-233.
- Kamenetzky, G. V., Cuenya, L., Pedron, V. y Mustaca, A. E. (2007). Condicionamiento de lugar en ratas y etanol. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy*, 7 (3), 321-333.
- Kandel, E., Schwartz, J. y Jessell, T. (2000). *Principios de neurociencia*. España: McGraw-Hill.
- Kawabe, T., Chitravanshi, V.C., Nakamura, T., Kawabe, K. y Sapru, H. N. (2009). Mechanism of heart rate response elicited by chemical stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain. Res.*, 1248, 115-126.
- Keay, K., y Bandler, R. 2001. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 25, 669-678.

- Khan, Z. U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A. y De la Calle, A. (1998). Differential regional and cellular distribution of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *Journal of Comparative Neurology*, 402 (3), 353-371.
- Khan, Z. U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A. y De la Calle, A. (2000). Dopamine D<sub>5</sub> receptors of rat and human brain. *Neuroscience*, 100 (4), 689-699.
- Kilts, C. D., Anderson, C. M., Ely, T. D. y Mailman, R. B. (1988). The biochemistry and pharmacology of mesoamygdaloid dopamine neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 537, 173-187.
- Korte, S. M. y Bohus, B. (1990). The effect of ipsapirone on behavioural and cardiac responses in the shock-probe/defensive burying test in male rats. *European Journal of Pharmacology*, 181(3), 307-310.
- LaBar, K. S., Gatenby, J. C., Gore, J. C., LeDoux, J. E. y Phelps, E. A. (1998). Human amygdale activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron*, 20 (5), 937-945.
- Laconi, M. R., Casteller, G., Gargiulo, P. A., Bregonzio, C. y Cabrera, R. J. (2001). The anxiolytic effect of allopregnanolone is associated with gonadal hormonal status in female rats. *European Journal of Pharmacology*, 417(1-2), 111-116.
- Lam, K. S, Aman, M. G. y Arnold, L. E. (2006). Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Research in Developmental Disabilities*. 27(3), 254-289.
- Lanari, A., Amenta, F., Silvestrelli, G., Tomassoni, D. y Parnetti, L. (2006). Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mechanisms Ageing Development*, 127(2), 158-65.
- LeDoux, J. E. (1996). *The emotional brain. The mysterious underpinnings of emotional life*. New York: Simon & Schuster Paperback.
- LeDoux, J. E. (1998). Fear and the brain: Where have we been and where are we going?, *Biol. Psychiatry*, 44, 1229-1238.
- LeDoux, J. E. y Nader, K. (1999). The dopaminergic modulation of fear: quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. *Behavioural Neuroscience*, 113(1), 152-165.
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155-184.
- LeDoux, J. E. (2003). The emotional brain, fear and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23(4-5), 727-838.
- Lehmann, H., Treit, D. y Parent, M. B. (2003). Spared anterograde memory for shock-probe fear conditioning after inactivation of the amygdala. *Learning and Memory*, 10(4), 261-269.

- Lehmann, H., Carfagnini, A., Yamin, S. y Mumby D. G. (2005). Context-dependent effects of hippocampal damage on memory in the shock-probe test. *Hippocampus*, 1(15), 18-25.
- Lehmann, H., Lecluse, V., Houle A. y Mumby D. G. (2006). Retrograde amnesia following hippocampal lesions in the shock-probe conditioning test. *Hippocampus*, 4(16), 379-387.
- Levey, A. I., Hersch, S. M., Rye, D. B., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., Kitt, C. A. y Price, D. L., Maggio, R., Brann, M. R., Ciliax, B. J. (1993). Localization of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(19), 8861-8865.
- Londei, T., Valentini, A. M. y Leone, V. G., (1998). Investigative burying by laboratory mice may involve non-functional, compulsive, behaviour. *Behav. Brain Res.*, 94, 249– 254.
- Macías Fernández, J. A. y Alonso del Teso, F. (Julio, 1998). Epidemiología, concepto, clasificación y evaluación clínica de los trastornos de ansiedad. *Curso en línea de Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de ansiedad en atención primaria*. 1ª entrega, recopilada el 28 de febrero de 2009, de <http://www.faes.es/cursos/cursoansiedadAP/curso/entrega1>
- Maltais, S., Côté, S., Drolet, G., y Falardeu, P. (2000). Cellular colocalization of dopamine D<sub>1</sub> mRNA and D<sub>2</sub> receptor in rat brain using a D<sub>2</sub> dopamine receptor specific polyclonal antibody. *Prog. Neuro-Psychopharmacol & Biol. Psychiat.*, 24, 1127-1149.
- Mansour, A. y Watson, Jr. S. J., 1995. Dopamine receptor expression in the central nervous system. En Bloom, F. E. y Kupfer, D. J. (Eds. 207-219) *Psychopharmacology IV Generation of Progress*. Nueva York: Raven Press.
- Maren, S. (2001). Neurobiology of pavlovian fear conditioning. *Annu. Rev. Neurosci*, 24, 897-931.
- Margolis, E. B., Mitchell, J. M., Ishikawa, J., Hjlmstad, J. O. y Fields, H. L. (2008). Midbrain dopamine neurons: projection target determines axon potential duration and dopamine D<sub>2</sub> receptor inhibition. *J. Neurosci.*, 28, 8908-8913.
- Martijena, I. D., Rodríguez Manzanares, P. A., Lacerra, C. y Molina, V. A. (2002). GABAergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdala. *Synapse*, 45(2), 86-94.
- McDonald, A. J. (1994). Neuronal localization of glutamate receptor subunits in the basolateral amygdala. *Neuroreport.*, 6(1), 13-16.
- Mead, A., Li, M. y Kapur, S. (2008). Clozapine and olanzapine exhibit an intrinsic anxiolytic property in two conditioned fear paradigms: Contrast with haloperidol and chlordiazepoxide. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90 (4), 551-562.
- Medina-Mora, M. E., Borges, G., Lara Muñoz, C., Benjet, C., Blanco Jaimes, J., Fleiz Bautista, C., Villatoro Velázquez, J., Rojas Guiot, E., Zambrano Ruíz,

- J., Casanova Rodas, L. y Aguilar-Gaxiola, S. (2003). Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental.*, 26 (4), 1-16.
- Menard, J. y Treit, D. (1996). Lateral and medial septal lesions reduce anxiety in the plus-maze and probe-burying tests. *Physiology and Behavior*, 60(3), 845-853.
- Menard, J. y Treit, D. (1998). The septum and the hippocampus differentially mediate anxiolytic effects of R(+)-8-OH-DPAT. *Behavioral Pharmacology*, 9(2), 93-101.
- Meyer, J. S. y Quenzer, L. F. (2005). *Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior*. E.U.A.: Sinauer Associates Inc.
- Milad, M. R. y Rauch, S. L. (2007). The role of the orbitofrontal cortex in anxiety disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1121, 546-561.
- Millan, M. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70, 83-244.
- Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S. y Mackey, S. C. (2009). Forebrain pain mechanisms. *Brain. Res. Rev.*, 60, 226-242.
- Oades, R. D. y Halliday, G. M. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology 1. Anatomy and connectivity. *Brain Research*, 432(2), 117-165.
- Özdemir, H. y Rezaki, M. (2007). Klüver-Bucy-like syndrome and frontal symptoms following cerebrovascular disease. *Turkish Journal of Psychiatry*, 18(2), 184-188.
- Paré, D. y Smith, Y. (1993). Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat. *Neuroscience*, 57(4), 1061-1076.
- Paré, D., Royer, S., Smith, Y. y Lang, E. J. (2003). Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985, 78-91.
- Paré, D., Quirk, G. J. y LeDoux, J. E. (2004). New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *The Journal of Neurophysiology*, 92 (1), 1-9.
- Paxinos, G. y Watson, C. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Londres: Elsevier Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E. y Briley, M. (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Meth.*, 14, 149–167.
- Pérez de la Mora, M. (2003). Dónde y cómo se produce la ansiedad: sus bases biológicas, *Ciencia*, 54, 16-28.
- Pérez de la Mora, M., Cardenas-Cachón, L., Vázquez-García, M., Crespo-Ramírez, M., Jacobsen, K., Höistad, M., Agnati, L. y Fuxe, K. (2005). Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D<sub>1</sub> antagonist SCH 23390 in the rat. *Neuroscience letters*, 377, 101-105.

- Pérez de la Mora, M., Lara-García, D.A., Jacobsen, K. X., Vázquez-García, M., Crespo-Ramírez, M., Flores-Gracia, C., Escamilla-Marván, E. y 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., Flores-Gracia, C., Crespo-Ramírez, M., Hernández-Gómez, A. M. y Lara-García, D. A. (2007a). La amígdala, una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad, en DeCelis, R. (Ed.), *Investigación en neurociencias. Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco (165-179 pp)*. Guadalajara, México: Editorial BiosMedica.
- Pérez de la Mora, M., Hernández-Gómez, A. M., Arizmendi-García, Y., Jacobsen K. X., Lara-García, D., Flores-Gracia, C., Crespo-Ramírez, M., Gallegos-Cari, A., Nuche-Bricaire, A. y Fuxe, K. (2007b). Role of the amygdaloid cholecystokinin (CCK)/gastrin-2 receptors and terminal networks in the modulation of anxiety in the rat. Effects of CCK-4 and CCK-8S on anxiety-like behaviour and [3H]GABA release. *European Journal of Neuroscience*. 12 (26), 3614-3630.
- Pérez de la Mora, M., Jacobsen, K. X., Crespo-Ramírez, M., Flores-Gracia, C. y Fuxe, K. (2008). Wiring and volume transmission in rat amygdala. Implications for fear and anxiety. *Neurochem. Res.* 33(8), 1618-1633.
- Pérez de la Mora, M., Gallegos-Cari, A., Arizmendi-García, Y., Marcellino, D. y Fuxe, K. (2009). Role of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety. *Progress in Neurobiology*. En prensa.
- Pesold, C. y Treit D. (1992). Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and the shock-probe burying tests. *Physiology and Behavior*, 52(1), 37-47.
- Pesold, C. y Treit D. (1994). The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*, 638(1-2), 295-301.
- Pesold, C. y Treit, D. (1995). The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*, 671(2), 213-221.
- Pesold, C. y Treit, D. (1996). The neuroanatomical specificity of the anxiolytic effects of intra-septal infusions of midazolam. *Brain Research*, 710(1-2), 161-168.
- Pezze, M. A., Bast, T. y Feldon, J. (2003). Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. *Cerebral Cortex Apr.* 13, 371-380.
- Pfleiderer, B., Zinkirciran, S., Arolt, V., Heindel, W., Deckert, J. y Domschke, K. (2007). fMRI amygdala activation during a spontaneous panick attack in a

- patient with panic disorder. *World Journal of Biological Psychiatry*, 8(4), 269-272.
- Phillips. A. G., Ahn, S., Howland, J. G. (2003). Amygdalar control of the mesocorticolimbic dopamine system: parallel pathways to motivated behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27(6), 543-554.
- Picazo, O., Estrada-Camarena, E. y Hernández-Aragón, A. (2006). Influence of the post-ovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *European Journal of Pharmacology*, 530(1-2), 88-94.
- Piefke, M., Pestinger, M., Arin, T., Kohl, B., Kastrau, F., Schnitker, R., Vohn, R., Weber, J., Ohnhaus, M., Erli, H.J., Perlitz, V., Paar, O., Petzold, E.R. y Flatten, G. (2007). The neurofunctional mechanisms of traumatic and non-traumatic memory in patients with acute PTSD following accident trauma. *Neurocase*, 13 (5), 342-357.
- Pinel, J. P. J. y Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 4(92), 708-712.
- Pinel, J. P. J. (2007). *Biopsicología*. España: Pearson Addison Wesley.
- Pitkänen, A. (2000). Connectivity of the rat amygdaloid complex, en Aggleton, J.P. (ed.), *The Amygdala: a functional analysis*. Nueva York: Oxford University Press (31-115 pp.).
- Ponnusamy, R., Nissim, H. A. y Barad, M. (2005). Systemic blockade of D2-like dopamine receptors facilitates extinction of conditioned fear in mice. *Learning and Memory*, 12, 399-406.
- Reis, F. L. V., Masson, S., De Oliveira, A. R. y Brandao, M. L. (2004). Dopaminergic mechanisms in the conditioned and unconditioned fear as assessed by the two-way avoidance and Light switch-off tests. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 79, 359-365.
- Rodgers, R. J., Nikulina, E. M. y Cole, J. C. (1994). Dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor ligands modulate the behavior of mice in the elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 49(4), 985-995.
- Rodgers, R. J. (1997). Animal models of "anxiety": where next?. *Behavioural Pharmacology*, 8, 477-496.
- Rojas, E. (2001). *La ansiedad: como diagnosticar y superar el estrés, las fobias y obsesiones*. México, D.F: Planeta Mexicana.
- Roosendaal, B., Koolhaas, J. M. y Bohus, B. (1991). Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiology and Behaviour*, 50(4), 777-781.
- Roth, R. H. y Elsworth, J. D. (1995) Biochemical pharmacology of midbrain dopamine neurons, en Bloom, F. E. y Kupfer, D. J. (editores) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Nueva York, USA: Raven Press.

- Royer, S., Martina, M. y Paré, D. (1999). An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 19(23), 10575-10583.
- Saha, S. (2005). Role of the central nucleus of the amygdale in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 32 (5-6), 450-456.
- Salgado, J. V., Vidal, M., Oberling, P., Guilherme Graeff, F., Danion, J.M. y Sandner, G. (2000). Associative learning and latent inhibition in a conditioned suppression paradigm in humans. *Behavioural Brain Research*, 117 (1-2), 53-60.
- Schafe, G. E., Nader, K., Blair, H. T. y LeDoux, J. E. (2001). Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.*, 24(9), 540-546.
- Scibilia, R. J., Lachowicz J. E. y Kilts, C. D. (1992). Topographic and non overlapping distribution of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain. *Sinapse*, 11,146-154.
- Seeman, P. y Van Tol, H. H. (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15 (7), 246-270.
- Sgoifo, A., de Boer S. F., Haller, J. y Koolhaas, J. M. (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiology and Behavior*, 60(6), 1403-1407.
- Shah, A. A. y Treit, D. (2003). Excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex attenuate fear responses in the elevated-plus maze, social interaction and shock probe burying tests. *Brain Research*, 969(1-2), 183-194.
- Shah, A. A. y Treit, D. (2004). Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Brain Research*, 996(1), 31-40.
- Shin, M. S. (2005). Vasoactive intestinal peptide in the amygdale inhibits tail flick reflexes in rats. *Brain. Res.*, 1040(1-2), 197-201.
- Siebert, M., Markowitsch, H. J. y Bartel, P. (2003). Amygdala, affect and cognition: evidence from 10 patients with Urbach-Wiethe disease, *Brain*, 126(12), 2627-2637.
- Siegel, G. J., (1994). *Basic Neurochemistry*. E.U.A: Raven Press.
- Siemiakowski, M., Maciejak, P., Wislowska, A., Zienowicz, M., Sienkiewicz-Jarosz, H., Szyndler, J., Czyonkowska, A. I., Bidzinski, A., Gryczynska, A. y Pyazni, A. (2004). Neophobia and cortical and subcortical binding of the dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist [3H]-raclopride. *Life Sciences*, 79, 753-761.
- Simón, V. M., Parra, A., Miñarro, J., Arenas, M. C., Vinader-Caerols, C. y Aguilar, M. A. (2000). Predicting how equipotent doses of chlorpromazine,

- haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. *Eur. Neuropsychopharmacology*, 10(3), 159-164.
- Sóvágó, J., Boglárka, M., Gulyás, B. y Hall, H. (2005). Autoradiographic mapping of dopamine-D2/D3 receptor stimulated [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding in the human brain. *European Journal of Neuroscience*, 22, 65-71.
- Steimer, T. (2002). The biology of fear and anxiety-related behaviors. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4(3), 231-249.
- Stevenson, C. W. y Gratton, A. (2004). Basolateral amygdala dopamine receptor antagonism modulates initial reactivity to but not habituation of the acoustic startle response. *Behavioural Brain Research*, 153, 383-387.
- Sullivan, G. M., Apergis, J., Bush, D. E., Johnson, L. R., Hou, M. y LeDoux, J. E. (2004). Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience*, 128(1), 7-14.
- Sun, N. y Cassel, M. D. (1993). Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *Journal of Comparative Neurology*, 330 (3), 381-404.
- Suzuki, M., Hurd, Y. K., Sokoloff, P., Schwartz, J. C. y Sedvall, G. (1998). D<sub>3</sub> dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain. Res.*, 779, 58-74.
- Swaisgood, R. S., Rowe, M. P. y Owings, D. H. (1999). Assessment of rattlesnake dangerousness by california ground squirrels: exploitation of cues from rattling sounds. *Anim. Behav.*, 57, 1301– 1310.
- Swanson, L. W. y Petrovich, G. D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neuroscience*, 21(8), 323-331.
- Taylor, B. K., Joshi, C. y Uppal, H. (2003). Stimulation of dopamine D<sub>2</sub> receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. *Brain.Res.* 987, 135-143.
- Tanaka, M., Yoshida, M., Emoto, H. e Ishii, H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European Journal of Pharmacology*, 405 (1-3), 397-406.
- Timothy, C., Costall, B. y Smythe, J. W. (1999). Effects of SCH 23390 and raclopride on anxiety-like behavior in rats tested in the black-white box. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, (62)2, 323-327.
- Treit, D. y Fundytus, M. (1988). A comparison of buspirone and chlordiazepoxide in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 30(4), 1071-1075.
- Treit, D. (1990). A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 36(1), 203-205.

- Treit, D., Pesold, C. y Rotzinger, S. (1993a). Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behavioral Neuroscience*, 107(5), 770-785.
- Treit, D., Robinson, A., Rotzinger, S. y Pesold, C. (1993b). Anxiolytic effects of serotonergic interventions in the shock-probe burying test and the elevated plus-maze test. *Behavioural Brain Research*, 54(1), 23-34.
- Treit, D., Menard, J. y Pesold, C. (1994). The shock-probe burying test. *Neuroscience Protocols*, 94-010-02, 01-09.
- Treit, D. y Menard, J. (1997). Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal, and amygdaloid lesions. *Behavioral Neuroscience*, 111(3), 653-658.
- Treit, D., Degroot, A., Kashluba, S. y Bartoszyk, G. D. (2001). Systemic EMD 68843 injections reduce anxiety in the shock-probe, but not the plus-maze test. *European Journal of Pharmacology*, 414(2-3), 245-248.
- Undie, A. S. y Friedman, E., 1990. Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 253, 987-992.
- Ungerstedt, U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 367, 1-48.
- Van de Kar, L. D. y Blair, M. L. (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol.*, 20(1), 1-48.
- Van Nobelen, M. y Kokkinidis, L. (2006). Amygdaloid GABA, not glutamate neurotransmission or mRNA transcription controls footshock-associated fear arousal in the acoustic startle paradigm. *Neuroscience*, 137(2), 707-716.
- Verdejo-García, A., Pérez-García, M., Sánchez-Barrera, M., Rodríguez-Fernández, A., y Gómez-Río, M. (2007). Neuroimaging and drug addiction: neuronatomical correlates of cocaine, opiates, cannabis and ecstasy abuse. *Rev. Neurol.*, 44(7), 432-439.
- Vianna, D. M. L. y Brandao, M. L. (2003). Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 557-566.
- Waddington-Lamont, E. y Kokkinidis, L. (1998). Infusion of the dopamine D<sub>1</sub> receptor antagonist SCH23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Research*, 795, 128-139.
- Walker, D. L. y Davis, M. (2002). The role of amygdala glutamate receptors in fear learning fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71(3), 379-392.
- Wang, H., Liang, S., Burgdorf, J., Wess, J. y Yeomans, J. (2008). Ultrasonic vocalizations induced by sex and amphetamine in M2, M4, M5 muscarinic and D<sub>2</sub> dopamine receptor knockout mice. *PLoS ONE*, 4(3), recopilado el 2

abril de 2008, de <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0001893>

- Weiner, D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. B., O'Dowd, B. F., Seeman, P. y Brann, M. R., (1991). D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1859-1863.
- Weiner, N. y Molinoff, P. B. (1994). Catecholamines. En Siegel, G.J., Agranof, B.W., Albers, R.W., Molinoff, P.R. (Eds.) *Basic Neurochemistry*. Nueva York: Raven Press (261-281 pp.)
- Wong, D. F., Brasić, J. R., Singer, H. S., Schretlen, D. J., Kuwabara, H., Zhou, Y., Nandi, A., Maris, M. A., Alexander, M., Ye, W., Rousset, O., Kumar, A., Szabo, Z., Gjedde, A. y Grace, A. A. (2008). Mechanisms of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in Tourette syndrome: clues from an in vivo neurochemistry study with PET. *Neuropsychopharmacology*, 33(6), 1239-1251.
- Wood, P. B. (2006). Mesolimbic dopaminergic mechanisms and pain control. *Pain*, 120, 230-234.
- Wook Koo, J., Han, J. y Kim, J. J. (2004). Selective neurotoxic lesions of basolateral amygdala and central nuclei of the amygdala produce differential effects on fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 24(35), 7654-7662.
- Yao, W., Spealman, R. D. y Zhang, J. (2008). Dopaminergic signaling in dendritic spines. *Biochemical pharmacology*, 75, 2055-2069.
- Yatham, L. N., Goldstein, J. M., Vieta, E., Bowden, C. L., Grunze, H., Post, R. M., Suppes, T. y Calabrese, J. R. (2005). Atypical antipsychotics in bipolar depression: potential mechanisms of action. *The Journal of Clinical Psychiatry*, (66)5, 40-48.
- Zhao, Y., Valdez, G. R., Fekete, E. M., Rivier, J. E., Vale, W. W., Rice, K. C., Weiss, F. y Zorrilla, E. P. (2007). Subtype-selective corticotropin-releasing factor receptor agonists exert contrasting, but not opposite, effects on anxiety-related behavior in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(3), 846-854.