

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA



**“EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DEL ANTAGONISTA
DOPAMINÉRGICO SCH23390 EN LA AMIGDALA DEL LÓBULO
TEMPORAL DE LA RATA, SOBRE LA EJECUCIÓN EN EL
PARADIGMA LUZ-OSCURIDAD: IMPLICACIONES SOBRE LA
ANSIEDAD “**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A :

LINDA ARACELI CÁRDENAS CACHÓN

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA

REVISOR: DR. CESAR CASASOLA CASTRO

PRESIDENTE: D. en C. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO

VOCAL: DRA. VERÓNICA MARÍA DEL CONSUELO ALCALÁ HERRERA

SECRETARIO: MTRA. MARÍA TERESA GUTIERREZ ALANIS

2017

CD.MX.



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.

AGRADECEMOS EL APOYO OTORGADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO (DGAPA) UNAM. (DONATIVOS IN205217) PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.



El presente trabajo se realizó en el Departamento de Neurociencias Cognitivas del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM bajo la Dirección del Dr. Miguel Pérez de la Mora y con el apoyo técnico de la Q. F. B. Minerva Crespo Ramírez, con el apoyo de CONACYT CB-2013-01-220173 Y Karolinska Institutet, Department of Neurosciences 348-2014-4396.

JURADO EVALUADOR.

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA

REVISOR: DR. CESAR CASASOLA CASTRO

PRESIDENTE: D. en C. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO

VOCAL: DRA. VERÓNICA MARÍA DEL CONSUELO ALCALÁ HERRERA

SECRETARIO: MTRA. MARÍA TERESA GUTIERREZ ALANIS

AGRADECIMIENTOS

A Mi Asesor de Tesis, Dr. Miguel Pérez de la Mora Que creyó en mí, por ser el primer contacto que tuve con la investigación científica y que me brindo las puertas de su laboratorio, por su ayuda y comentarios siempre acertados durante el desarrollo de este trabajo, no olvidare todas sus enseñanzas Gracias.

A las Técnicas, Minerva Crespo y Natalia Aguilar por transmitirme sus conocimientos y brindarme su apoyo incondicional que hizo posible la realización de esta tesis Gracias.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biofísica: que aún están aquí, (Daniel, Alfredo, Ana María, Candy) y los que partieron en busca de la realización de sus ideales (Mariana) por brindarme su amistad y ayuda para la realización de esta tesis Gracias.

Al Dr. Cesar Casasola Castro por ser mi tutor interno en la Facultad de Psicología, por su apoyo y contribución sustancial en mi formación académica y profesional, por su tiempo y esfuerzo dedicado, por los puntos de vista nuevos que me ayudaron a aprender cosas nuevas y ampliar mi panorama Gracias.

Al Dr. Alfonso Escobar por contribuir a mi formación académica y profesional durante mi estancia en la Facultad.

A la Maestra. Selma Serratos por su esmero y dedicación en la impartición de sus conocimientos para mi formación académica y profesional

A la Dra. Irma Yolanda del Rió Portilla por colaborar en mi desempeño académico.

A la Maestra. Isaura López Segura por su apoyo y orientación siempre acertada.

A la Dra. Gabriela Orozco, Selene Cansino y Verónica Alcalá, a todas ellas por impartirme sus conocimientos en el área fisiológica.

Al Dr. José Luis Bonjorquéz, por brindarme su apoyo para mi restablecimiento físico

Al Lic. Omar Torre blanca y al personal que labora en el área de audio visuales de la facultad de Psicología por brindarme su apoyo durante mi servicio social.

A mí amiga Herlinda Escamilla, por encaminarme siempre hacia el logro de una meta más.

A mí cuñada Araceli, por impulsarme siempre hacia el logro de una meta más.

A mi compañero y amigo Ricardo Laguna López, por brindarme su apoyo, y motivación para concluir una meta mas en mi vida.

Al personal que labora en la biblioteca de la facultad de Psicología por brindarme su apoyo durante mi estancia en la facultad Gracias.

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

A la Maestra Teresa Gutiérrez Alanis, por su apoyo en la revisión de esta tesis y sus comentarios acertados Gracias.

Al Dr. Fructuoso Ayala Guerrero por su tiempo y esfuerzo dedicado, en la revisión de esta tesis Gracias.

DEDICATORIAS

Gracias primero que nada a ti señor
Por ser la luz que ilumina mi camino
Por haberme permitido vivir
Hasta el momento y alcanzar mi meta.

Dedico este trabajo de tesis:

A Mis Padres y Hermanos: Que me han brindado su apoyo siempre en la salud y en la enfermedad así como en situaciones difíciles demostrándome en cada momento que a pesar de las adversidades de la vida, todo se puede lograr. Hoy les brindo un logro más, como prueba de mi agradecimiento.

A Mis hermanos fallecidos Verónica y Ramón que siempre fueron un ejemplo de constante superación y apoyo.

A Mi difunto esposo: Que me brindo en vida su comprensión, apoyo y fortaleza sin esperar nada a cambio para llegar a cumplir una meta más en mi vida.

“Mientras el cerebro humano sea una incógnita, el universo, reflejo de su estructura, será también un misterio.”

(Ramón y Cajal)



© Can Stock Photo - csp6294643

“Las cosas que se ven, se oyen y se perciben, son las que prefiero, pero también malos testigos son los ojos y oídos para los hombres, si poseen espíritus que no comprenden su lenguaje”

Heráclito (550-480 a.c)

I N D I C E

RESUMEN	Página.
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	
1.- ANSIEDAD	11
1.1 Etimología de la palabra ansiedad.	11
1.2 Diferentes enfoques y definiciones de ansiedad.	11
1.3 Diferencia entre miedo, ansiedad y estrés.	11
1.4 Clasificación clínica de la ansiedad	12
1.5 Epidemiología de la ansiedad.	14
2.-PARADIGMAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD.	14
2.1 Condicionamiento clásico y operante	15
2.2 Modelos animales de ansiedad.	16
2.2.1 Modelos no condicionados	17
2.2.2 Modelo de la caja- luz-oscuridad	18
2.2.3 Pruebas no condicionadas	18
3.- EL SISTEMA LIMBICO	19
3.1 Partes del sistema límbico involucradas en la ansiedad	21
3.2 La amígdala cerebral.	22
3.2.1 Las islas intercaladas paracapsulares	24
3.2.2 Participación de la amígdala en la ansiedad	26
4.-NEUROTRANSMISORES IMPLICADOS EN LA ANSIEDAD	30
4.1 Tipos de neurotransmisores implicados en el sistema nervioso	30
4.2 Neurotransmisores implicados en la ansiedad	32
4.2.1 Dopamina	33
4.2.2 Liberación de la dopamina	33
4.2.3 Tipos de receptores dopaminérgicos	35
4.2.4 Dopamina, amígdala y ansiedad	35
III. JUSTIFICACIÓN	37
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL.	37
1 OBJETIVOS	37
2 HIPÓTESIS	38
3 VARIABLES	38
4 MATERIAL Y MÉTODO.	

5	PROCEDIMIENTO.	43
5.1	Manipulación conductual	43
5.2	Cirugía estereotáxica	43
5.3	Sesión prueba “caja luz oscuridad y campo abierto”	44
5.4	Microinyección bilateral aguda	45
5.4.1	Prueba “caja luz-oscuridad”	45
5.4.2	Prueba “campo abierto”	46
5.5	Perfusión Registro conductual	46
5.6	Localización de cánulas	47
5.7	Corte y montaje de tejido	47
5.8	Tinción de Nissl (Cristal violeta)	47
5.9	Análisis Histológico	48
5.10	Diseño experimental	49
5.11	Diseño estadístico	50
V.	RESULTADOS.	
1.	VERIFICACION HISTOLÓGICA	50
2.	EFFECTOS CONDUCTUALES: CAJA LUZ OSCURIDAD	53
2.1	Efectos de la micro-inyección bilateral del SCH23390 sobre la conducta de la rata en la prueba “caja luz –oscuridad”	53
2.2	Latencia para entrar al compartimiento oscuro de la caja “luz –oscuridad”	53
2.3	Tiempo de permanencia en el compartimiento iluminado de la caja “luz –oscuridad”	54
2.4	Número de transiciones entre los compartimientos de la caja “luz –oscuridad” (número de visitas al espacio oscuro).	54
2.5	Número de elongaciones desde el compartimiento oscuro hacia el iluminado de la caja “luz-oscuridad”	55
3.	EFFECTOS CONDUCTUALES: LOCOMOCIÓN	56
3.1	Locomoción en la caja” luz-oscuridad”	
	A. Compartimiento iluminado	57
	B. Compartimiento oscuro	57
	C. Compartimiento iluminado +compartimiento oscuro	58
3.2	Campo abierto	59
	A. Locomoción horizontal	59
	B. Locomoción vertical (“ rearings”)	60
VI.	DISCUSION	62
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO I		72
Pérez de la Mora M, Cárdenas Cachón LA, Vázquez García M, Crespo Ramírez M, Kirsten Jacobsen, Malin Hôistad, Luigi Agnati, Kjell Fuxe. Anxiolytic effect of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. Neuroscience Letters 2005, 377:101-105.		

ANEXO II		
Glosario		77
ANEXO III		79
Índice de Tablas		
Índice de Figuras		
Diagrama de Trabajo		
Índice de Fotografías		
ANEXO IV		
Hojas de calificación.		
Hoja de calificación conductual del modelo “caja luz-oscuridad”.		81
Hoja de calificación conductual del modelo “campo abierto”.		82
Esquema anatómico para la localización de cánulas implantadas Tomado del Atlas de Paxinos y Watson (1986).		
Nivel Br -2.12 mm		83
Nivel Br -2.30 mm		84
Nivel Br -2.56 mm		85

RESUMEN

La ansiedad es un mecanismo adaptativo que alerta al individuo contra un peligro potencial. Sin embargo, cuando se presenta en ausencia de estímulo o resulta desproporcionada con respecto a él se le considera patológica. Experimentos de lesión o estimulación indican que la amígdala cerebral juega un papel importante en la integración y expresión del miedo y la ansiedad en varias especies de animales, entre los que se incluyen tanto a los roedores como a los humanos. Las islas intercaladas paracapsulares son agrupamientos de neuronas GABAérgicas ricas en receptores dopaminérgicos del tipo D1, que a manera de interface, regulan el flujo de impulsos nerviosos entre los núcleos basolateral y central de la amígdala, que constituyen su principal estación entrada y salida respectivamente. Dado que es comúnmente aceptado que la ansiedad se genera en el núcleo basolateral, y que la respuesta ansiosa se implementa en el núcleo central, se consideró de interés estudiar el papel que tienen dichas islas, y en particular el que juega la transmisión dopaminérgica mediada por receptores D1 en la modulación amigdalina de la ansiedad. Para ello, el efecto del bloqueo de dichos receptores, mediante la micro-administración estereotáxica bilateral de diversas dosis (0, 30 y 120 μg) de su antagonista específico, el SCH23390, en la proximidad de las islas intercaladas paracapsulares fue estudiada en la rata usando la Caja Luz-Oscuridad, un modelo de ansiedad incondicionado. El estado general de los animales fue evaluado midiendo el grado de su locomoción en un campo abierto. Los resultados obtenidos indican que la micro-administración bilateral del SCH23390 disminuyó la ansiedad de los animales incrementando significativamente tanto la latencia de las ratas para entrar por primera vez al compartimento oscuro de la caja como el tiempo que permanecieron en él. No se observaron cambios en la locomoción de los animales en el campo abierto bajo ninguna dosis del antagonista usado, excluyéndose así la posibilidad de que los cambios observados en los parámetros de ansiedad estudiados en la Caja Luz Oscuridad fueran debidos a un efecto del antagonista sobre el estado general de la rata. Los resultados obtenidos sugieren que los receptores dopaminérgicos D1 ejercen un papel ansiogénico en la modulación amigdalina de la ansiedad y que este pudiera estar mediado a través de un aumento en la desinhibición diferencial que estas islas ejercen sobre la actividad del núcleo central de la amígdala.

I. INTRODUCCIÓN.

La ansiedad es un mecanismo adaptativo que alerta al individuo en contra de un peligro potencial, pero cuando esta se presenta sin ningún estímulo que la desencadene se considera una patología, que en algunos casos invalida socialmente al individuo (Pérez de la Mora, 2003). Una de las estructuras del sistema límbico de gran importancia para el estudio de la ansiedad es la amígdala cerebral (Davis y Whalen, 2001; Millan, 2003). Experimentos en los que se lesiona la amígdala cerebral de un animal o se le estimula han mostrado que dicha estructura juega un papel importante en la integración y expresión del miedo y la ansiedad, en varias especies de animales, incluyendo ratas y humanos. (Klüver y Bucy, 1937; Davis y Shí, 2001 y Tres Guerres, 1992; Ardila, 1975). En la porción rostral a la amígdala cerebral encontramos un grupo de neuronas GABAérgicas, ricas en receptores dopaminérgicos D1, conocidas con el nombre de islas intercaladas paracapsulares (Millhouse, 1986), encargadas de regular el flujo de impulsos nerviosos entre el complejo basolateral, que recibe la información sensorial del entorno del sujeto y el núcleo central donde se integran distintos componentes autonómicos de la ansiedad (Royer et al., 2000).

Por otro lado, dado que se ha reportado, que inyecciones intra-amigdalinas del antagonista específico D₁(SCH23390), reduce la respuesta acústica del sobresalto potenciado por el miedo (Lamont y Kokkinidis, 1998) y el “congelamiento condicionado” en ratas (Guarraci et al, 1999) es posible que mecanismos dopaminérgicos estén involucrados en la modulación de la ansiedad a nivel de las islas intercaladas paracapsulares. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del antagonista dopaminérgico D1(SCH23390), sobre la conducta de la rata en la “caja luz oscuridad”, un paradigma incondicionado usado para evaluar la ansiedad en la rata (Costall et al., 1989).

II. ANTECEDENTES

1.-ANSIEDAD

La ansiedad es un problema fascinante que involucra lo más íntimo del funcionamiento del cerebro, que desde el punto de vista de la salud afecta a un gran número de personas y que en algunos casos podría invalidar socialmente a quien la padece.

1.1 Etimología de la palabra ansiedad

El origen de la palabra “ansiedad” deriva del vocablo latino *anxietas* y significa, de acuerdo al Diccionario de la real Academia Española de la Lengua “un estado de agitación, inquietud o zozobra del ánimo”. La palabra *angustia*, del mismo origen etimológico, denota en cambio, de acuerdo a la misma fuente bibliográfica, “angostura, dificultad, aflicción, congoja, ansiedad”. (Pérez de la mora et al., 2007).

El origen de la palabra “ansiedad” viene del Latín *anxius* que deriva de *ango* y se vincula al vocablo *angustia*, que tiene su origen en el significado de angostura y opresión (Goldman,2001).

1.2. Diferentes enfoques y definiciones de ansiedad

Biológicamente, la ansiedad, como la define Pérez de la Mora (2003), es la respuesta adaptativa de un sistema de alarma que prepara al organismo a contender en contra de un peligro potencial. De acuerdo con esta definición, la ansiedad es un mecanismo normal que en condiciones normales protege y alerta de posibles peligros potenciales a un individuo y se presenta en los seres humanos con distintos niveles de intensidad. Sin embargo, cuando su nivel es alto provoca un trastorno patológico, que se acompaña de un estado hipervigilancia, de dificultad para concentrarse, de un aumento en la tensión muscular y de síntomas autonómicos tales como palpitaciones, sudoración, falta de aliento o molestias digestivas entre otros síntomas (DSM-IV, 1995).

1.3. Diferencia entre miedo, ansiedad y estrés

Dado su carácter adaptativo, es difícil separar a la ansiedad del miedo y del estrés ya que los síntomas somáticos y cognoscitivos de estas dos últimas entidades son parecidos y prácticamente indistinguibles de los que se observan en la ansiedad, pues resultan de la activación del mismo sistema de alarma (Pérez de la Mora, 2003). Una diferencia entre el miedo y la ansiedad, podría ser, que el miedo es provocado por un estímulo más o menos bien definido para el sujeto, en tanto que en la ansiedad el estímulo u objeto que la desencadena no es obvio para él. De hecho, la ansiedad y el miedo podrían coexistir al mismo tiempo, pues un individuo

puede temer a alguna situación bien definida, pero le angustia la forma como esta va a ocurrir. En cuanto al estrés, se ha definido este de diferente forma de acuerdo con su propia orientación. El pionero en la investigación sobre el estrés Hans Selye en 1936, considera al estrés como una respuesta inespecífica del organismo a cualquier exigencia ambiental. Holroyd y Lazarus en 1982, definieron al estrés en términos psicológicos, como el juicio cognoscitivo del individuo que le produce temor al pensar que sus recursos personales serán incapaces de dar respuesta a las demandas generadas por un acontecimiento particular. El estrés, por su lado, significa tensión y designa una agresión provocada por una acción violenta ejercida sobre el organismo, como un ruido estridente, una sacudida eléctrica intensa o un choque emocional y es más difícil de diferenciar de la ansiedad pues tanto los estímulos que la provocan como la respuesta dada son prácticamente indistinguibles en ambos casos (Papalia y Olds, 2004).

El término estrés, tomado del inglés stress, es aún más vago, pues 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 (Pérez de la mora et al., 2007).

De acuerdo con lo anterior, la ansiedad y el estrés resultarían términos sinónimos y el miedo una variante de ellos, en la que el estímulo que la provoca es conocido. Eventualmente, la ansiedad podría diferenciarse del estrés por la frecuencia en la que se presentan los estímulos. En la ansiedad bastaría que se presentara el estímulo ansiogénico una sola vez para que la respuesta se diera, en tanto que en el estrés el sujeto estaría por largo tiempo bajo la acción del estímulo "estresante". Por otro lado aunque es bien conocido que en el estrés existe un aumento de la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) caracterizado por un aumento en los niveles plasmáticos del factor de liberación de corticotropina, (llamada antes ACTH) y de los glucocorticoides (Kalat., 2008) dichos cambios, de acuerdo a lo anterior, se observan también en la ansiedad clínica (Daneri, 2012) y en animales expuestos a paradigmas de ansiedad (Pellow et al., 1986; Korte et al., 1992; De Boer y Koolhaas, 2003; Flores-Gracia et al., 2010).

1.4. Clasificación clínica de la ansiedad

La ansiedad en su forma patológica da lugar a diversos cuadros clínicos distintivos, en donde con frecuencia el límite que separa a la ansiedad normal de la ansiedad patológica no es muy claro.

Con la ayuda de sistemas clasificatorios como el CIE/10 o el DSM IV se ha podido clasificar a los diferentes trastornos de la ansiedad en diversas categorías. De acuerdo al DSM IV (1995) estos se clasifican en:

Crisis de angustia o de pánico, se caracteriza por la aparición súbita de síntomas de aprensión, miedo pavoroso o de terror y que se acompañan habitualmente de sensación de muerte inminente. Existen en ella, una gran variedad de síntomas autonómicos, pero que a diferencia de lo que sucede en otros casos estos adquieren una gran intensidad y su presentación es intrusiva, sin que haya ningún estímulo bien definido que lo provoque.

Agorafobia, se caracteriza por la aparición de ansiedad o comportamientos de evitación en lugares o situaciones donde escapar puede resultar difícil como un túnel o un puente.

Angustia sin agorafobia, se caracteriza en cambio, por crisis de angustia o de pánico recidivante e inesperado que causan un estado permanente de preocupación al paciente, pero sin los síntomas de la agorafobia.

Trastorno de angustia con agorafobia se caracteriza por crisis de angustia y agorafobia de carácter recidivante e inesperado.

Agorafobia sin historia de trastorno de angustia, se caracteriza por la presencia de agorafobia, pero sin síntomas similares a la angustia en un individuo sin antecedentes de crisis de angustia inesperadas.

Fobia específica, se caracteriza por la presencia de niveles elevados de ansiedad como respuesta a situaciones u objetos específicos que no representan un peligro real para el paciente.

Fobia social, se caracteriza por la presencia de niveles elevados de ansiedad como respuesta a la exposición del sujeto a diversas situaciones sociales o actuaciones en público.

Trastorno obsesivo compulsivo, se caracteriza por la presencia de obsesiones que provocan ansiedad y malestares significativos y/o compulsiones que tienden a neutralizar dicha ansiedad.

Trastorno por estrés post traumático, se caracteriza por la re-experimentación de acontecimientos altamente traumáticos, que provocan en el que lo padece verdaderos ataques de pánico.

Trastorno por estrés agudo, es similar al trastorno por estrés postraumático, pero los síntomas de ansiedad aparecen inmediatamente después de un acontecimiento altamente traumático, como después o durante un temblor de tierra.

Trastorno de ansiedad generalizada, es similar a los de las crisis de pánico, pero en él, los síntomas aunque persistentes son de menor intensidad. En él, se da siempre un estado de preocupación excesiva.

Trastornos debidos a enfermedad médica, se caracteriza por síntomas de ansiedad secundarios a una enfermedad subyacente.

Trastorno de ansiedad inducido por sustancias, se caracteriza por síntomas de ansiedad prominentes que se consideran secundarios al uso de una droga, fármaco o tóxico.

Trastorno de ansiedad no especificado, se refiere a toda aquella condición que cursa con niveles de ansiedad elevados no considerada en lo anterior.

1.5. Epidemiología de la ansiedad

La prevalencia durante la vida para cualquier trastorno de ansiedad es de alrededor del 25 por ciento y la prevalecía para 12 meses es de 17 por ciento (Heinze, 2003).

El inicio de los trastornos de la ansiedad se presenta generalmente durante la adolescencia temprana, siendo las fobias específicas las que se inician más precozmente. Los diferentes trastornos de ansiedad son más frecuentes en mujeres que en hombres, con excepción de la fobia social, que suele presentarse en un porcentaje semejante en ambos sexos (Heinze, 2003). En la tabla 1 se indica la prevalencia de los trastornos de ansiedad a lo largo de la vida del ser humano.

Tabla 1. Prevalencia de la ansiedad a lo largo de la vida del ser humano.

Diagnóstico	Porcentaje
Fobia social y especifica	13%
Agorafobia	7%
Estrés postraumático	9%
Crisis de angustia	1.6 –3.5%
Ansiedad generalizada	3.5 – 5 %
Trastorno obsesivo-compulsivo	1.4 – 2 %

Tomado de Heinze (2003).

A pesar de la alta prevalencia de los trastornos afectivos y de ansiedad en el humano, los índices que indican el uso de servicios para su tratamiento son bajos. Así, en un estudio realizado en 1997 por Medina-Mora y cols., en la ciudad de México, se encontró que solo el 13.9% de los hombres y mujeres que cubrían con el criterio de depresión consignado en del DSM IV buscaron ayuda, y que los médicos de primer nivel de atención fueron la fuente de ayuda más frecuente para poblaciones de niveles socioeconómico medio y bajo, ocupando los psicólogos el segundo lugar de consulta (CONADIC INFORMA, Boletín Especial abril-07-2001).

2.- PARADIGMAS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD

Por razones éticas, metodológicas y prácticas, para el estudio de la ansiedad se ha recurrido al uso de modelos animales, cuyos resultados son contrastados con la evidencia derivada de los estudios realizados en los humanos utilizando diversas técnicas y aproximaciones. La experimentación con animales nos ha permitido aprender con una mayor profundidad mucho de las regiones del sistema nervioso que participan en la ansiedad y de los mecanismos involucrados en ella.

2.1.-Condicionamiento Clásico y Operante

A Principios del siglo XX, Ivan Petrovic Pavlov (1849-1936) fisiólogo ruso, fue el primero en estudiar los cambios conductuales inducidos experimentalmente en animales e hizo algunas aportaciones notables, tales como el descubrimiento de los reflejos condicionados y el condicionamiento clásico (pavloviano o respondiente) derivado de ellos (Kantowitz et al., 2001).

Pavlov, en el curso de sus investigaciones observó sin proponérselo que la simple vista de los alimentos hacía babear a los perros y que de hecho estos lo hacían, incluso, al oír el sonido de los pasos del experimentador. Como resultado de sus estudios descubrió que el sonido de una campana que normalmente no modificaba la cantidad de saliva que los perros producían, lo hacía ahora, si se había tenido el cuidado de presentar dicho sonido poco antes de alimentarlos. Era como si los perros hubieran aprendido que el sonido de dicha campana indicaba la llegada de la comida. Se les había condicionado a producir saliva ante un nuevo estímulo: el sonido de una campana, que anteriormente no provocaba en ellos ninguna respuesta.

El experimento de Pavlov ejemplifica los cuatro elementos básicos del condicionamiento clásico. El primero, es un estímulo incondicionado, como la comida, que invariablemente produce el segundo elemento del condicionamiento, segundo la respuesta incondicionada, que en este caso es la producción de saliva. El tercer elemento es el estímulo neutral, el sonido de la campana, que posteriormente al condicionamiento recibe el nombre de estímulo condicionado.

Se dice que el estímulo condicionado es originalmente “neutro” respecto a la respuesta deseada (salivación), porque los perros no producen saliva al oír la campana a menos que se les haya condicionado para que reaccionen así, presentándoseles varias veces antes del estímulo incondicionado. El apareamiento de ambos produce el cuarto elemento del condicionamiento clásico: la respuesta condicionada (RC). Esta es la conducta que el animal aprendió a dar en respuesta al estímulo condicionado (Morris y Maisto, 2001).

En 1912, M. P. Erofeeva, discípula de Pavlov, provocó sin proponérselo, perturbaciones en la conducta de perros con los que practicaba diversas variantes experimentales tendientes a establecer, mantener y extinguir los reflejos condicionados. Erofeeva observó, que perros sometidos a condicionamiento mediante choques eléctricos desarrollaban diversas alteraciones conductuales al variar la aplicación del estímulo a diferentes lugares del cuerpo.

Posteriormente, Shenger Krestovnikova, otra discípula de Pavlov, en experimentos de discriminación de señales, entrenó a perros para que distinguieran entre un círculo y una elipse. Es sus experimentos, cuando aparecía el círculo el animal obtenía comida, pero no, cuando se les mostraba la elipse. Pavlov, interpretó estos fenómenos como resultado de excitación o de inhibición generalizadas del sistema nervioso central, según el tipo de estímulos y los síntomas de los animales.

Por su lado, Edward Lee Thorndike realizó experimentos en los que puso a gatos en cajas-problema de las que se suponía que debían escapar. Thorndike efectuó sus estudios casi al mismo tiempo que los de Pavlov. En suma los experimentos de Thorndike concernían al aprendizaje a partir de las consecuencias de cierta acción. Los gatos dieron cierta respuesta que les permitía escapar de la caja-problema. Luego, cuando los regresaban a la caja solían responder de la misma manera. Las consecuencias de una conducta influían en la forma en que ésta se aprendía. Como el comportamiento era instrumental (o cumplía una función) en la generación de la consecuencia (la recompensa), esta forma de aprendizaje se denominó posteriormente como condicionamiento instrumental (Kantowitz et al., 2001; Morris y Maisto, 2001).

De 1930 a 1960 Burrhus Frederic Skinner, llama al condicionamiento instrumental condicionamiento operante, pues la respuesta opera en el ambiente, y lo distingue de lo que denomino condicionamiento respondiente, llamado por los seguidores de Pavlov condicionamiento clásico. En el condicionamiento respondiente el organismo simplemente responde a la estimulación del medio. El principal dato de interés en el estudio del condicionamiento operante es la tasa a la que se da cierta respuesta y en la que el experimentador aguarda hasta que el animal responde de la manera deseada; luego lo recompensa, v.g. con alimento. Si no responde como se espera el investigador refuerza el estímulo por el método de aproximaciones sucesivas hasta obtener la respuesta deseada.

El condicionamiento operante funciona según la ley del efecto: si se produce la respuesta operante y a está la sigue un estímulo reforzador, aumenta la posibilidad de que la respuesta ocurra nuevamente. Lo que ha de servir como estímulo reforzador no se especifica de antemano, tiene que descubrirse en cada situación (Kantowitz et al., 2001).

Con Seligman y cols en 1969, se establece la hipótesis, de la indefensión aprendida, donde se estudiaba una variante de aprendizaje en perros, a los cuales se mantenía sujetos mediante un arnés de tipo pavloviano y se les administraban choques eléctricos dolorosos pero no dañinos, los animales no contaban con ningún recurso que les permitiera evitar el choque; ante lo inevitable los perros aprendían que nada de lo que hicieran los salvaba de recibir el choque (Morris y Maisto, 2001; 2005).

2.2.- Modelos animales de ansiedad

Como se mencionó antes, para conocer los mecanismos biológicos que subyacen a la ansiedad, se han diseñado modelos experimentales, que permiten someter a un animal a determinadas manipulaciones en el laboratorio y evaluar el grado de ansiedad producido por ellas.

Los modelos, se aplican bajo condiciones en las que se minimiza el sufrimiento del animal y de acuerdo a la normatividad vigente para el uso y manejo de animales de laboratorio. Los modelos usados se clasifican en condicionados e incondicionados, dependiendo de si su aplicación implica el condicionamiento previo del animal o se estudia el impacto que la manipulación experimental tiene sobre la ansiedad basal del sujeto. Dichos modelos han sido ampliamente investigados y validados mediante criterios que incluyen el uso de algunas sustancias ansiolíticas o ansiogénicas, que en los humanos provoca una disminución o aumento en la ansiedad respectivamente.

Entre los modelos incondicionados encontramos: la prueba Luz-Oscuridad, el Laberinto Elevado en Forma de Cruz”, la Prueba de Choque y Enterramiento y la Interacción Social. Los modelos condicionados incluyen entre otros la prueba de conflicto de Vogel la Evitación Pasiva y el Sobresalto Potenciado por el Miedo.

2.2.1 Modelos no condicionados

En el paradigma denominado Laberinto en Forma de Cruz se explota el miedo innato de los roedores a explorar los espacios abiertos. En este modelo, se utiliza un laberinto que posee dos brazos que se encuentran cerrados por mamparas de 40 cm de altura y dos brazos abiertos que se interceptan en un cuadrado central

de 10 cm. Los brazos en ambos casos son de 50 cm. En esta prueba, la rata es colocada en el cuadrado central y tiende a explorar preferentemente los brazos cerrados. Se ha observado que aquellas condiciones experimentales que producen ansiedad reafirman esta conducta, en tanto que las que la disminuyen aumentan tanto la frecuencia de las visitas como la permanencia de la rata en los brazos abiertos del laberinto (Pellow y File, 1986; Pérez de la Mora, 2003).

En el modelo del Choque y Enterramiento se aprovecha la tendencia que tienen los roedores a sepultar objetos que pueden ser potencialmente dañinos, en este caso, un objeto considerado por los roedores como peligroso, como lo es una varilla electrificada que proporciona un choque eléctrico de baja intensidad cuando el animal la toca con la boca o la nariz húmeda. En este modelo, se evalúa el tiempo que tardan las ratas en comenzar a enterrar la varilla después de haber recibido el primer choque eléctrico y el tiempo que emplea en enterrarla. Una latencia corta y un tiempo de enterramiento largo indican un aumento de la ansiedad en el animal. Dicha conducta, puede ser revertida por fármacos ansiolíticos, algunos antidepresivos tricíclicos y también por algunas hormonas esteroides como la progesterona y algunos derivados de ella que se considera tienen efectos ansiolíticos (Contreras et al., 2003).

En el paradigma denominado Interacción Social se aprovecha la resistencia que oponen las ratas a interactuar físicamente dentro de un pequeño espacio con animales de la misma especie y con los cuales no ha tenido ningún acercamiento o encuentro previo (File, 1980).

2.2.2.- Modelo de la “caja luz - oscuridad”

La prueba de la “caja luz-oscuridad”, que se usará en este trabajo, está basada en el modelo original de Crawley y Goodwin (1980). Dicha prueba, ha sufrido varias modificaciones en su estructura en manos de varios autores como Costall y cols, 1989, quienes han modificado la distribución de los compartimientos y Young y Johnson (1991 a, b) que incrementaron su tamaño.

La prueba de la “caja luz-oscuridad” fue utilizada inicialmente por Costall et al. (1989) en ratones, pero ha sido adaptada a ratas (Henninger et al., 2000). La prueba consiste en una caja de acrílico dividida en dos compartimientos, uno blanco (27 x 27 x 27 cm), cuya base está dividida en cuadrantes de 9 x 9 cm mediante líneas dibujadas en negro, y un compartimiento negro (27 x 18 x 27 cm), cuya base también está dividida en cuadrantes de las mismas dimensiones que el anterior aunque por líneas blancas. Ambos compartimientos se conectan entre sí a través de una pequeña abertura de 7 x 7cm. El espacio blanco, se encuentra iluminado por una fuente de luz blanca fría (700 lux) y el espacio negro con una lámpara roja (70 lux). La prueba, que es de tipo exploratoria y no condicionada, explota la aversión innata de los roedores para áreas brillantes e iluminadas, así como, el conflicto que le ocasiona al roedor dejar el compartimiento oscuro que le

proporciona seguridad y explorar el otro que le ocasiona ansiedad debido a su iluminación intensa. En la prueba, un elevado número de visitas y tiempo prolongado en el espacio iluminado indican una menor ansiedad, en tanto que el número de transiciones entre ambos compartimientos y la locomoción en el espacio oscuro son índices de actividad general.

2.2.3 Pruebas condicionadas

En la Prueba de Conflicto de Vogel (1971), los animales después de permanecer un determinado tiempo privados de agua son introducidos en un dispositivo experimental que cuenta con bebederos que les proporcionan un pequeño choque eléctrico en el momento preciso en que su lengua se pone en contacto con el tubo por donde fluye el líquido que intentan beber. En dicha prueba, el animal se enfrenta con el conflicto que implica permanecer sediento, o beber agua y recibir un choque eléctrico. Las condiciones experimentales que disminuyen la ansiedad tienden a minimizar el conflicto y hacen que el animal beba. Por el contrario, aquellas condiciones que aumentan la ansiedad, agudizan el conflicto y dejan al animal sediento.

La prueba de Evitación Pasiva es utilizada en situaciones de aprendizaje y memoria emocional. Consiste en una caja que consta de 2 compartimentos uno blanco y otro oscuro, cuyo piso está cubierto por una rejilla electrificada que proporciona un “choque” al animal cada vez que este entra a él. El roedor aprende durante la aplicación de la prueba a “evitar” su paso por este último compartimiento. Bajo condiciones que disminuyen la ansiedad aumentan la exploración del compartimiento oscuro (Car y Wisniewska, 2006).

En el Condicionamiento al Miedo, el animal estudiado aprende a conocer la asociación entre un estímulo inicial inofensivo (un sonido o un destello luminoso) y uno capaz de provocar daño (un choque eléctrico). En esta prueba, se necesitan varias sesiones de apareamiento de los estímulos, tras de los cuales el estímulo inofensivo se convierte en un estímulo condicionado capaz de provocar en el animal respuestas condicionadas como las que se presentan en la ansiedad o el miedo. Entre las respuestas que se observan se incluyen la potenciación de algunos reflejos, la emisión de vocalizaciones de alta frecuencia, el congelamiento o pasmo del animal, y la defecación. En una variante de esta prueba, el Sobresalto Acústico Inducido por el Miedo, se condiciona a un animal a temer la presentación de un choque eléctrico tras la aparición de una luz (estímulo condicionado). Dado que bajo estas condiciones se ha generado en el animal un estado de miedo o de ansiedad condicionado que le aumenta sus reflejos, la aplicación de un sonido fuerte, tras la presentación del estímulo condicionado (luz), produce un sobresalto mayor que el observado en animales a los cuales no se les ha condicionado al miedo (Missredino et al., 1990; Takeshi et al., 2000).

En todos estos modelos, drogas o manipulaciones experimentales que aumentan las respuestas de temor son consideradas ansiogénicas, mientras que las que lo disminuyen son ansiolíticas (Pérez de la Mora, 2003).

3.-EL SISTEMA LIMBICO

El llamado circuito límbico, invocado como la base anatómica de las emociones se encuentra formado por un grupo de regiones cerebrales que incluyen entre otras al núcleo talámico anterior, la amígdala cerebral, el hipocampo, la corteza cerebral y partes del hipotálamo. En la Tabla 2 se muestra una breve historia de los descubrimientos que vincularon al sistema límbico con la emoción.

Tabla 2 .Breve historia del sistema límbico y las emociones.

En 1878, **Paul Broca** denominó lóbulo límbico al anillo de tejido cortical que rodea el hilio de cada uno de los hemisferios cerebrales. El anillo está formado por corteza cerebral, en la descripción de Broca se incluye la circunvolución del cíngulo (Escobar Briones, 2002), la circunvolución sub-callosa, la circunvolución parahipocámpica y la formación hipocámpica. Todas estas estructuras fueron agrupadas también con el nombre de rinencéfalo, el cual se supuso estaba relacionado con la olfacción.

Sanger Monroe Brown y E.A.Schafer, en 1888, llevaron a cabo estudios en monos con lobectomía bitemporal, sus observaciones fueron iguales a las que ahora se describen dentro del síndrome de Kluver y Bucy (*Philos Trans Roy Soc London Ser B* 1888; 179:303-327)

William James, en 1890, postula la teoría de la emoción (*The Principles of Psychology*, Vol II., Holt, New York, 1900)

En 1895, **L. Bianchi** practica estudios experimentales de lesión de los lóbulos frontales y describe anomalías experimentales tales como indiferencia y reactividad exagerada con miedo a ruidos imprevistos y presencia de otros animales (*Brain* 1895; 18:497-522)

Santiago Ramón-Cajal, en 1901, concluye que el complejo hipocampo-fornix no tiene relación directa con el sistema olfativo (*Trab Lab Investig Biol* 1901-1902; 1:1-140)

En 1929, **Walter Bradford Cannon**, describe los cambios somáticos y viscerales que señalan la importante participación del hipotálamo y del sistema simpático en la expresión de las emociones (*Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. An Account of Recent Researches into the Function of Emotional Excitement*, Appleton, New York, 1929)

En 1937, **James Wenceslas Papez**, fue el primero en establecer el sustrato anatómico de la emoción en las estructuras límbicas de la línea media (*Arch Neurol Psychiat* 1937; 38:725-743)

Para 1937, **Heinrich Kluver y Paul C Bucy** analizan los cambios conductuales subsecuentes a la lobectomía temporal en el Macaco rhesus, que incluye pérdida de la respuesta emocional, "ceguera psíquica, patrón sexual extraño, tendencia oral, compulsión a examinar objetos, y cambios en hábitos dietéticos (*Amer J Physiol* 1937; 119:352-353)

Paul I. Yakovlev, en 1948, incluye en el sistema límbico a las áreas corticales orbitofrontal, insular, temporal anterior y sus conexiones con la amígdala y el núcleo dorsomedial del tálamo (*J Nerv Ment Dis* 1948; 107:313-335)

Posteriormente, el nombre de sistema límbico fue acuñado por el fisiólogo **MacLean** en 1949-1952, refiriéndose a este como un sistema funcional formado por varios núcleos, siendo dos de sus estructuras más importantes el hipocampo y la amígdala o complejo amigdalino. Este sistema tiene que ver en gran medida con los impulsos básicos de todas aquellas conductas que son necesarias para la supervivencia como el miedo, la furia; así como las expresiones de placer, dolor, angustia, etc. (Brailowsky, 1995) en Lara Ayala (1998)

En 1959, **S. Mullan Y Wilder Penfield** señalan la participación de la neocorteza temporal ("corteza interpretativa") como áreas de convergencia de las sensaciones específicas que determinan la emoción (*Arch Neurol Psychiat*, 1959; 81:269-284)

Paul D. Mc Lean, en 1970, introduce el concepto filogenético del cerebro "triuno" en el que el sistema límbico actúa como modulador de las emociones entre el cerebro reptiliano y neocortical (*The Neurosciences. Second Study Program*. Rockefeller Univ. Press, 1970; 336-349)

En 1971, **Kenneth E. Livingston y Alfonso Escobar**, proponen una nueva interpretación anatómica y funcional del sistema límbico en la que relacionan de manera armónica a los componentes medial y basolateral de la amígdala (*Arch Neurol*, 1971; 24:17-21)

Modificado a partir de Escobar y Aguilar (2002).

3.1.- Partes del sistema límbico implicados en la ansiedad

Dentro de las regiones que conforman al sistema límbico destacan por su papel en la ansiedad el hipocampo, el septum, la estría terminal, la amígdala cerebral, y el hipotálamo, encargados de integrar la respuesta cognoscitiva, neuro-hormonal y neuroquímica de la emoción y el estrés.

El hipotálamo participaría en el mantenimiento de recuerdos matizados con contenido emocional y la corteza orbito-frontal sería necesaria para junto con ellas implementar las respuestas emocionales (Tres Guerres, 1992).

El hipocampo, que proyecta hacia el septum medial, es una porción de la corteza cerebral que forma una especie de cuerno a lo largo de la curvatura del ventrículo lateral, presenta una estructura laminar con un circuito básico de retroalimentación que se origina en la corteza entorrinal. El hipocampo se divide en: hasta de Ammon, giro dentado y complejo subicular; sus aferencias proceden de la corteza entorrinal, del hipocampo contra-lateral y de estructuras subcorticales como: el septum medial, ciertos núcleos del rafe, el locus coeruleus y el núcleo fastigial del cerebelo. Al parecer el hipocampo como la amígdala, posee receptores para una larga lista de hormonas esteroideas, neurotransmisores y neuropéptidos que actúan como mensajeros químicos. La estimulación eléctrica del hipocampo, produce menos efectos vegetativos que la estimulación de otras estructuras límbicas. La lesión quirúrgica del hipocampo en humanos produce un déficit de memoria anterograda, es decir la dificultad para formar nuevas memorias y para retener nuevos conocimientos (Papalia y Olds, 2004).

El área septal se localiza por adelante del hipocampo, formando la pared medial del ventrículo lateral. El septum recibe aferencias de la amígdala, hipotálamo y de la formación del hipocampo (capa CA3). La lesión de los núcleos septales en ratas produce hipermotricidad e hiperreactividad, así como un aumento de las respuestas agresivas, sobre todo frente a estímulos poco familiares para el animal. La lesión del septum en ratas, produce una facilitación del aprendizaje de pruebas de evitación activa, así como un déficit en el aprendizaje de pruebas de evitación pasiva. Estos fenómenos son parecidos a los que se observan tras lesiones del hipocampo y opuestos a los que se observan tras lesiones de la amígdala, estos resultados pueden deberse al aumento inespecífico de la actividad motriz que se produce tras la lesión del septum (Ardila, 1975).

La corteza orbitofrontal es la porción de la neocorteza más directamente relacionada con el sistema límbico, con el hipotálamo y con la corteza frontal lateral de quien recibe información sensorial del mundo externo. A través del núcleo dorsomedial del tálamo, sobre el que proyectan estructuras como la amígdala, el septum, el tegmento mesencefálico ventromedial, el núcleo interpeduncular etc., la corteza orbitofrontal recibe información del mundo interno. La lesión de esta corteza en monos, provoca la desaparición de las respuestas de rabia y angustia, disminuyendo su agresividad.

La “estría terminalis”, es un largo fascículo de fibras que conectan porciones de la amígdala cerebral con el hipotálamo.

3.2.- La amígdala cerebral

El término amígdala cerebral, complejo amigdalino o núcleo amigdaloides, fue utilizado por primera vez en 1819 por el anatomista Burdach para describir una masa de sustancia gris en forma de almendra (amígdala) localizada en el polo temporal del cerebro y que constituye lo que ahora se denomina el núcleo basolateral de la amígdala. Dicha estructura fue considerada en 1867 por Maynert como la extensión ventro-medial del claustrum, una capa de sustancia gris localizada entre la cápsula externa y la extrema, que separa a esta estructura de la ínsula. A la amígdala original se le fueron añadiendo nuevos núcleos y fue Johnston quien en 1923 la describió en función de sus estructuras nucleares y de las relaciones topográficas entre ellas. La descripción y caracterización de los núcleos amigdalinos dada por Johnston prevalece hasta nuestros días con pocas modificaciones.

Para Johnston (1923), la amígdala estaba constituida por una serie de núcleos filogenéticamente antiguos (el núcleo central y el medial) y otros de reciente adquisición (los núcleos basal, lateral y cortical), ver Figura 1. De acuerdo con este autor, en el embrión humano existen dos crestas longitudinalmente orientadas en el piso del ventrículo lateral que en el curso del desarrollo dan lugar a diferentes estructuras. La cresta lateral origina el cuerpo estriado y la medial origina la cama de la estría terminal. La cresta medial, como consecuencia del gran desarrollo de la cápsula interna se fragmenta en etapas posteriores de la ontogenia en dos polos, el anterior que en el adulto forma el “núcleo cama de la estría terminal propiamente dicho y el polo posterior que origina a los núcleos central y medial de la amígdala. Como reminiscencia de su origen, entre las estructuras resultantes de esta fragmentación quedan entre ambos polos masas de sustancia gris embebidas en las fibras de la estría terminal, entre los que destaca el núcleo sublenticular. Los núcleos que se originan de la cresta medial, que incluyen al núcleo cama de la estría terminal, al central, al medial y a las masas de sustancia gris que se encuentran entre ellos han sido agrupados recientemente en lo que Alheid y Heimer (1988) han llamado la amígdala extendida. Por su lado, los núcleos cortical, basal y lateral, que de acuerdo con Johnston se encuentran anatómicamente asociados a lo que él llamó la fisura amigdaloides, forman lo que hoy conocemos como la amígdala cortico-basolateral. Cabe destacar que en muchas especies los límites entre los núcleos lateral y basal se pierden originándose el llamado complejo basolateral.

Estudios recientes han validado las sugerencias de Johnston, al grado que su clasificación inicial es la base para las diferentes clasificaciones de los núcleos amigdalinos que existen actualmente. Por otro lado, con base en su morfología neuronal, conectividad y sistemas de neurotransmisión, los núcleos amigdalinos han sido integrados en dos sistemas el cortico-basolateral que agrupa a los núcleos cortical, basal y lateral y el estriatal constituido por el núcleo central y el

medial. Dichos sistemas corresponderían respectivamente al grupo de núcleos recientes y primitivos de Johnston. El sistema cortico-basolateral utiliza glutamato y posee características similares a las de la corteza cerebral y el estriado, en cambio, es de naturaleza GABAérgica, y se comporta como el estriado.

A pesar de que por lo señalado anteriormente parecerían que embriológica y anatómicamente existen dos amígdalas diferentes, sus núcleos se encuentran ampliamente interconectados, y funcionalmente existe cooperación entre ellos. Así, de acuerdo con Swanson y Petrovich (1998), independientemente de su filiación, los núcleos de la amígdala podrían agruparse para generar sistemas funcionales distintos.

Así, dentro de la esfera olfatoria, representada anatómicamente por una gran porción de la amígdala, los núcleos cortical anterior, posteromedial, medial, y posterior reciben información feromonal del bulbo olfatorio accesorio, proveniente del órgano vomeronasal. Por su parte, el bulbo olfatorio principal envía el resto de la información olfatoria tanto a los núcleos amigdalinos corticales (núcleo cortical anterior, posterolateral, área piriforme, área de transición postpiriforme y núcleo posterior) como a los basales (basal lateral posterior y basal medial anterior y posterior).

Por otro lado, el sistema fronto-parietal, muy relacionado con el claustrum y con la corteza frontal y temporal, se integra con la participación de los núcleos lateral y basolateral anterior Swanson y Petrovich (1998). Finalmente, el sistema autonómico, que recibe información, ya sea directa o indirecta de todos los núcleos de la amígdala y constituye su vía principal de salida, incluye tanto al núcleo central como al medial. Dichos núcleos proyectan tanto al hipotálamo, como a la sustancia gris periacueductal y a una gran variedad de núcleos autonómicos en el tallo cerebral, que en su conjunto son responsables de muchas de las manifestaciones autonómicas y conductuales que se presentan en el miedo y la ansiedad.

Las conexiones de la amígdala son complejas y su descripción detallada escapa al propósito de esta sección de la tesis, referimos por tanto al lector a los excelentes artículos de Swanson y Petrovich (1998) y McDonald (2003) como fuente de información y referencias. Sin embargo, para nuestros fines vale la pena señalar que existe una amplia comunicación, casi siempre bidireccional, entre los diferentes núcleos de la amígdala, así como entre ellos y diversas regiones extra-amigdalinas que permite la asociación e integración de diferentes tipos de información y la generación de respuestas conductuales apropiadas ante situaciones que real o potencialmente pudieran amenazar a un sujeto.



Bregma -2.12 mm

Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).

Figura1. La amígdala una estructura anatómica con relevancia en la ansiedad. En la figura se muestra un corte coronal de cerebro de rata que de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986) atraviesa la amígdala a nivel -2.12 con respecto al bregman. Dentro de la región que ocupa la amígdala, se indica la localización del complejo basolateral (BLA), el núcleo central (CeA) y la isla intercalada principal (I),(BMA) núcleo baso medial amigdaloides.

3.2.1. Las islas intercaladas paracapsulares

Aunque la existencia de las islas intercaladas dentro de la amígdala había sido puesta de manifiesto desde 1910 en el lemur (Volsch, 1910) y fueron consideradas como integrantes de la amígdala por Johnston (1923), habían pasado relativamente desapercibidas hasta el estudio realizado por Millhouse en 1986 (Millhouse, 1986). Dichas islas, forman una red o malla que cubre la mitad rostral del complejo basolateral, expandiéndose de una parte a otra de esta localidad y continúan rostralmente por debajo de la comisura anterior.

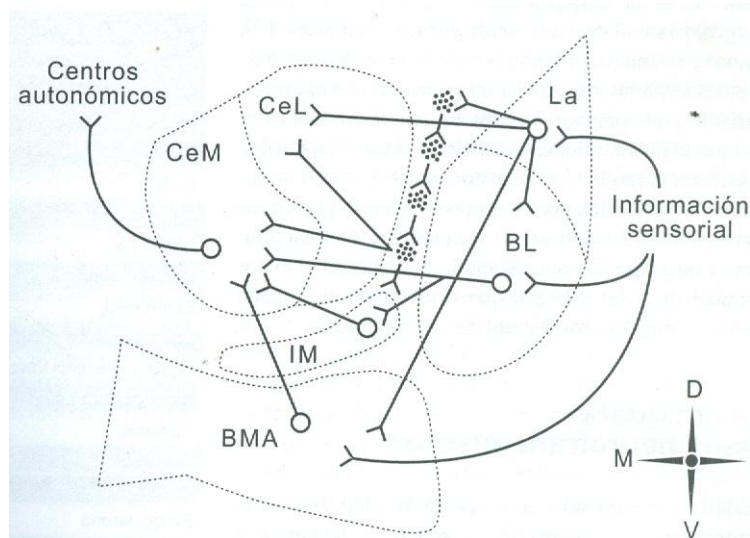
Dentro de las islas existen dos tipos de neuronas intercaladas, neuronas medianas y neuronas grandes: las neuronas intercaladas medianas son las más comunes. Su circunferencia somática abarca de 9 a 18 μm de diámetro y por lo regular sus axones tienen ramilletes locales. Sus axones terminan en el núcleo central o basolateral de la amígdala y algunos de ellos parecen entrar a la cápsula externa.

Las neuronas intercaladas grandes son de dos tipos: en forma de columna (espinosas) y en forma de vértebras (no espinosas). La mayoría de las neuronas intercaladas grandes son no espinosas, aunque algunas veces tienen espinas distribuidas a lo largo de sus dendritas. Ambas variedades de neuronas miden alrededor de 60 μm de circunferencia, siendo sus dendritas largas, gruesas y

tienen algunas puntas y pocas secciones ramales con punta. No se conocen todas las aferencias de las células intercaladas, sin embargo destacan aquellas provenientes del núcleo basolateral de la amígdala y de la corteza prefrontal. Sin embargo, estos agrupamientos de neuronas reciben probablemente aferencias de otras estructuras tales como las cortezas piriforme y entorrinal, el área preóptica lateral, el hipotálamo lateral y el núcleo accumbens.

Estudios recientes han mostrado que las células de las islas intercaladas son GABAérgicas (Paré y Smith, 1993) y monopolizan la distribución de los receptores dopaminérgicos D1 dentro de la amígdala (Scibila et al., 1992). Sin embargo, Fuxe et al. (2003), han demostrado, que al menos en la isla intercalada principal, existe un gradiente de inervación dopaminérgica latero-medial y rostro-caudal, pues la densidad de terminales dopaminérgicas que la inervan es muy abundante en su porción rostromedial pero escasa a nivel de sus porciones mediales y caudales. Dicho patrón de inervación sugiere que en estas últimas regiones la transmisión dopaminérgica podría estar mediada por difusión de dopamina (transmisión por volumen) proveniente de sus regiones más rostrales y laterales. Dicho gradiente de inervación dopaminérgico parece afectar también a algunas de las islas intercaladas y paracapsulares situadas más ventralmente, en donde la inervación dopaminérgica disminuye conforme se localizan más caudalmente.

Aunque el papel de las islas intercaladas dentro de la amígdala no es totalmente conocido, dadas las características de su conectividad es posible que funcionen como una interface GABAérgica inhibitoria entre el complejo basolateral y el núcleo central de la amígdala y entre la corteza cerebral y el núcleo baso-lateral ó el central (Royer et al., 1999; Marowski et al., 2005). Más aun, estudios de Royer et al. (2000), han mostrado que las células intercaladas amigdalinas poseen sus prolongaciones polarizadas pues tienen sus dendritas dirigidas lateralmente (dorsalmente en la rata) y sus axones dirigidos medialmente (ventralmente en la rata). Dado que dichas islas se comunican entre ellas, tal polarización sugiere, que dada su naturaleza GABAérgica, las islas intercaladas laterales (dorsales en la rata) inhibirían a las mediales (ventrales en la rata).



Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).

Figura 2. Muestra las conexiones intra-amigdalinas. Note como la porción lateral (La) y la basolateral (BL) del complejo basolateral, que en su conjunto concentra diversos tipos de información sensorial, proyectan directamente o indirectamente, vía cúmulos de células denominadas intercalada principal (IM) o paracapsulares, a distintas porciones del núcleo central (CeL=centrolateral;CeM= centromedial) pero que solo en la división medial de este núcleo existen células de proyección que envían fibras eferentes a los distintos centros autonómicos encargados de generar los síntomas y signos característicos de la ansiedad. La localización de las estructuras de acuerdo a los ejes dorsolateral y latero-medial se indica en el lado inferior derecho de la figura.

3.2.2. Participación de la amígdala en la ansiedad

La amígdala es una estructura facultada para reconocer los peligros inminentes del entorno y preparar a los sujetos para enfrentarse contra peligros potencialmente agresivos (Pérez de la Mora, 2003). De acuerdo con la teoría más en boga (Davis, 1998; Le Doux 2000; 2003), el complejo basolateral recibe información que procede tanto del exterior como del interior del sujeto y que tras de ser procesada localmente es enviada entre otras estructuras al núcleo central de la amígdala, al núcleo cama de la estría terminal, al núcleo accumbens y a la corteza prefrontal.

Muy probablemente, de acuerdo con esta teoría, el núcleo basolateral es el encargado de tomar la decisión sobre enfrentar o no un riesgo que atenta potencialmente en contra de la integridad del sujeto, puesto que dentro de este núcleo confluye una gran cantidad de información tanto somática como visceral y sensorial. Más aún, es en esta estructura, en donde la información relativamente cruda que, a través tálamo, envían los sistemas somato-sensoriales es contrastada con el mismo tipo de información pero ya procesada por la corteza

cerebral (Le Doux, 2003). Por otro lado, dentro de este complejo basolateral se ha demostrado la existencia de importantes mecanismos de potenciación a largo plazo (LTP), que podrían ser el sustrato fisiológico subyacente en la generación del miedo condicionado y en la formación y almacenamiento de “memorias emocionales” (Le Doux, 2003).

De ser tomada la decisión de enfrentar el peligro que amenaza potencialmente al sujeto por el complejo basolateral, toca al núcleo centro-medial de la amígdala y al núcleo cama de la estria terminal (Davis, 1998, Davis y Whalen, 2001), que como se señaló antes, poseen una amplia conectividad con centros autonómicos y hormonales y somáticos, implementar una respuesta autonómica, somática y conductual acorde con la naturaleza y magnitud de la amenaza. Por su parte, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, también interconectados bilateralmente con el complejo basolateral, se encargarían de ajustar la motivación del sujeto de acuerdo con el nivel de ansiedad “decidido” y muy probablemente de generar la conciencia de ella respectivamente (Pérez de la Mora, 2003).

Aunque, de acuerdo con lo anterior, el flujo de información dentro de la amígdala iría del complejo basolateral, que concentra información, al núcleo central, que genera respuestas de ansiedad, existen evidencias experimentales que sugieren que dicho flujo de impulsos nerviosos estaría modulado por una interfase de naturaleza GABAérgica. Dicha interfase constituida por la isla intercalada principal y el resto de las islas intercaladas paracapsularesse interpone entre ambos núcleos y a manera de un “switch” sería capaz de inhibir o desinhibir a las neuronas de proyección del núcleo central (Royer et al., 1999; Paré et al. 2004; Marowski et al., 2005; Pérez de la Mora et al., 2007).

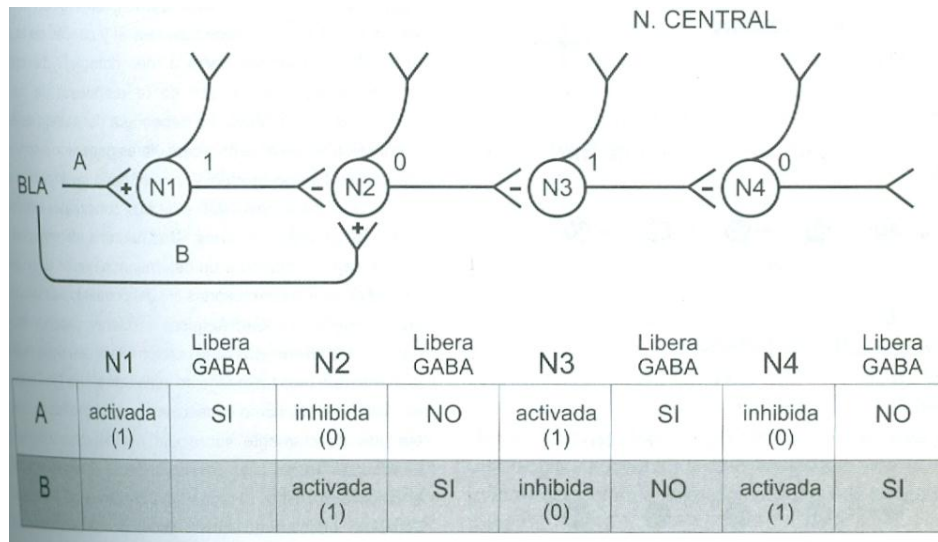
En relación con esto, es necesario recordar que neuronas GABAérgicas localizadas en una isla en particular se comunican con neuronas GABAérgicas presentes en otras islas y que como consecuencia de la polaridad dorso-ventral que exhiben sus dendritas y axones, las neuronas insulares paracapsulares dorsales tendrían la capacidad de inhibir a aquellas neuronas localizadas en islas más ventrales (Royer et al., 2000). Así, como consecuencia de esta cadena de inhibición es recurrente entre neuronas insulares GABAérgicas, como se observa en la Figura 3 y 4, se establece un código de neurotransmisión “binario” (1,0,1,0,1,0,1,0.....), a través del cual, se podría regular el flujo de impulsos nerviosos del núcleo basolateral, y aún de otras estructuras extra-amigdalinas, al núcleo central. De acuerdo con esto, grupos de neuronas GABAérgicas inhibitorias (N_1) localizadas en una determinada isla, al disparar (1) sobre neuronas GABAérgicas inhibitorias (N_2) presentes en islas más ventrales las inhibirán. Como consecuencia de ello, tales neuronas (N_2) dejarían de disparar (0) e inhibir a su vez a neuronas GABAérgicas (N_3) dispuestas en islas más ventrales aún. Dichas neuronas (N_3), libres de la inhibición impuesta por las neuronas (N_2) estarán en condiciones ahora de disparar (1) e inhibir (0) a otras neuronas GABAérgicas (N_4) más medialmente dispuestas, y así sucesivamente. Como resultado de esta serie

dinámica de inhibiciones y desinhibiciones, la información enviada por el complejo basolateral al núcleo central repercutirá, a cada momento, en forma diferente sobre la salida (output) del núcleo central y por tanto sobre la naturaleza y evolución de la respuesta autonómica, pues dicha salida dependerá:

- a) De la posición de los grupos de neuronas GABAérgicas insulares inicialmente estimulados por parte del complejo basolateral u otras estructuras extra-amigdalinas.
- b) De las islas paracapsulares activas e inactivas tras esta estimulación y
- c) De las conexiones de cada una de ellas con las neuronas del núcleo central.

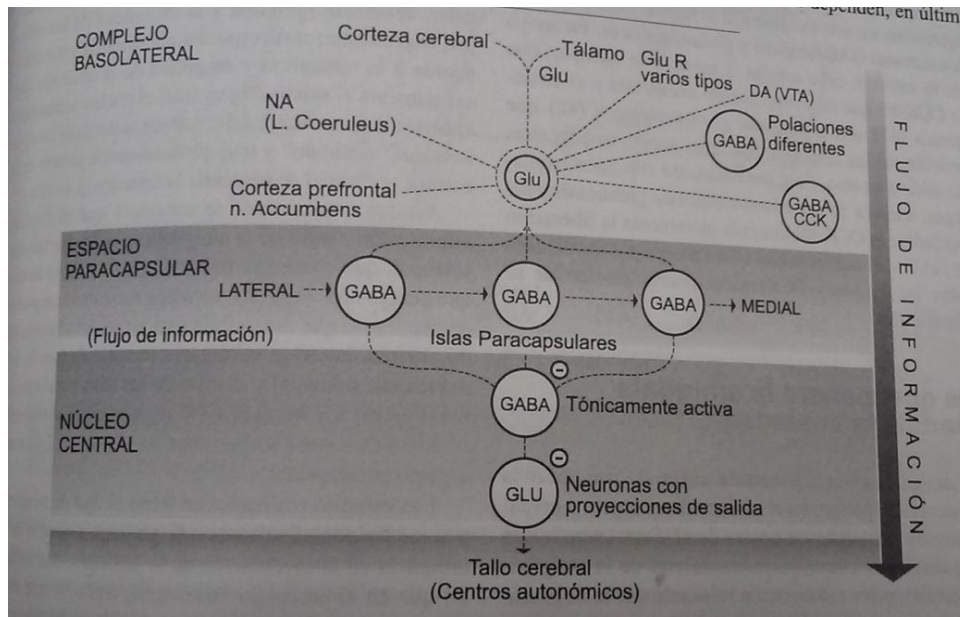
La salida de información del núcleo central hacia distintos centros autonómicos requerirá (véase la Figura 3.), como ha sido señalado anteriormente, de la desinhibición de las células que proyectan hacia ellos, lo cual se lograría, de acuerdo con lo discutido antes, gracias a la inhibición de las neuronas GABAérgicas locales localizadas en la porción lateral del núcleo central, y/o de islas paracapsulares ventrales activas que mantienen a las neuronas amigdalinas de proyección inhibidas (Sun et al., 1994; Fuxe et al., 2003, Paré et al., 2004; Pérez de la Mora et al., 2007).

De particular interés para el funcionamiento de las neuronas de las islas intercaladas paracapsulares, resulta la actividad de las neuronas dopaminérgicas, ya que estas podrían regular la ansiedad, modulando la poderosa influencia glutamatérgica que se ejerce a nivel de dichas islas, pues las neuronas GABAérgicas insulares reciben una poderosa influencia glutamatérgica del núcleo basolateral y son ricas en receptores dopaminérgicos D₁ (Fuxe et al., 2003). Así, la activación de los receptores dopaminérgicos D₁ por la dopamina liberada de los ricos plexos dopaminérgicos localizados a nivel de la porción rostral lateral de la isla intercalada principal y del resto de las islas intercaladas paracapsulares podría facilitar la transmisión glutamatérgica a ese nivel y la consiguiente producción de síntomas y signos de ansiedad (Pérez de la Mora et al, 2007).



Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).

Figura3. Muestra el establecimiento de un sistema binario durante el paso de impulsos a través de las islas paracapsulares de la amígdala. El tráfico de impulsos entre los núcleos basolateral(BL) y central de la amígdala es controlado por neuronas GABAérgicas inhibitorias a nivel de la isla intercalada principal y las islas paracapsulares. Dichas islas conectadas “en serie” se inhiben una a la otra en dirección latero-medial generando un sistema binario (0,1,0,1.....) de neurotransmisión. En la porción “A” del cuadro anexo se indica, que mientras una célula se inhibe (0) como resultado de la acción del GABA liberado sobre sus dendritas, su vecina, localizada medialmente, al perder su control inhibitorio se activa (1) y así sucesivamente. El establecimiento de este sistema binario es dinámico y depende del sitio (B) y de la temporalidad (no indicada en la figura) de la isla(N) activada por las aferentes excitatorias provenientes del complejo basolateral. La respuesta ansiogénica implementada por el núcleo central dependerá de la identidad de las islas paracapsulares (N1-4) activadas o inhibidas y de la naturaleza de sus conexiones con neuronas de dicho núcleo (+),excitación;(-)inhibición.



Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).

Figura 4. Muestra el flujo de información dentro de la amígdala. Dentro de esta estructura, la información sensorial y sensitiva proveniente del entorno de un sujeto, acarreada por eferentes talámicas y corticales, confluye en el complejo basolateral, donde tras su procesamiento, realizado con el concurso de diversos sistemas de transmisión es reenviada al núcleo central y otras regiones para la implementación de una respuesta acorde a la naturaleza y magnitud del riesgo experimentado. El tráfico de información entre ambos núcleos es controlado por neuronas localizadas en las islas paracapsulares.

4. NEUROTRANSMISORES IMPLICADOS EN LA ANSIEDAD

4.1. Tipos de neurotransmisores implicados en el sistema nervioso

El estudio de la neurobiología nos permite comprender los fenómenos responsables de la comunicación química entre las neuronas. Una misma neurona es capaz de sintetizar y liberar más de un neurotransmisor en sus diferentes sinapsis (Tres Guerres, 1992).

De acuerdo a su estructura química, los neurotransmisores se clasifican en tres categorías generales: monoaminas, aminoácidos y neuropéptidos. Las monoaminas son también llamadas aminas biogénicas, incluyen a la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina (que se conocen también como catecolaminas debido a su estructura química común), a la serotonina, la acetilcolina y la histamina. Los neuropéptidos, incluyen las endorfinas (u opióides endógenos) y muchos otros como la colecistoquinina, la angiotensina II, la neurotensina ó la hormona liberadora de corticotropina (Goldman, 2001).

Los neurotransmisores son sustancias que, una vez liberadas sinápticamente por las neuronas, alteran la actividad de otras neuronas al interactuar con ciertas moléculas proteicas ubicadas en la superficie denominadas receptores. Las moléculas receptoras son específicas para cada neurotransmisor y forman un complejo funcional con los elementos de transducción y amplificación de la célula post-sináptica, capacitando a esta para responder a cada ligando extracelular (Siegel et al., 1994).

Sinápticamente se conocen dos tipos de receptores:

1. Receptores ionotrópicos, su activación abre o cierra un canal iónico específico en la membrana sináptica alterando directamente la excitabilidad de la misma, ya sea aumentando los niveles de despolarización, o hiperpolarización que experimenta.

2. Receptores metabotrópicos, su activación induce un cambio en el metabolismo de la célula en la sinápsis que puede modificar indirectamente su excitabilidad y causar cambios plásticos, ó incluso alterar la expresión genética a nivel transcripcional. En los receptores metabotrópicos, la ocupación y activación del receptor es convertida en una señal intracelular que va a actuar como segundo mensajero e iniciar la activación o inhibición de un proceso celular dado, como se observa en la siguiente Figura 5.

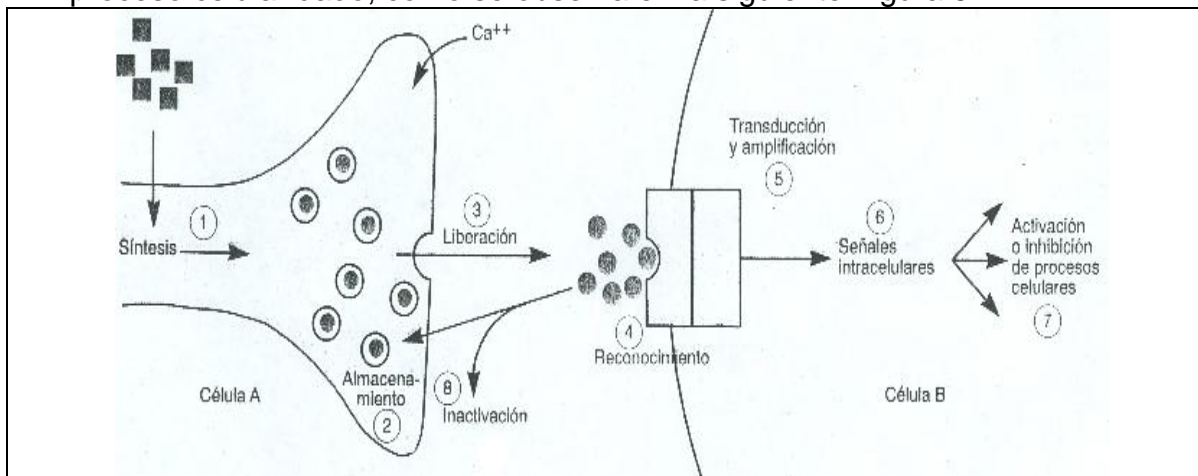


Figura 5. Muestra un esquema general de la comunicación química entre una neurona y una célula efectora. Una sustancia sintetizada en la célula "A" a partir de precursores circulantes (1) es almacenada en vesículas en la terminal presináptica (2), liberada por un estímulo adecuado a través de un mecanismo dependiente de calcio (3) y reconocida por receptores específicos en la superficie de la membrana de la célula B (4). La ocupación del receptor es traducida y amplificada por mecanismos moleculares específicos a nivel de la membrana postsináptica (5), desencadenando diferentes señales intracelulares (6) que actuando como segundos mensajeros llevan a la activación o inhibición de diferentes procesos celulares (7). La acción del transmisor es finalizada mediante su inactivación enzimática en el espacio sináptico o su recaptación al interior de la terminal (8).

Tomado de Tres Guerres (1992).

4.2. Neurotransmisores implicados en la ansiedad

Dada la complejidad de la ansiedad es muy probable que en ella participen prácticamente todos los neurotransmisores conocidos, sin embargo, algunos de ellos parecen tener mayor importancia o al menos su papel es más conocido. Dado que esta tesis no tiene un carácter monográfico, a pesar de la innegable importancia de muchos de ellos, nos hemos concentrado la descripción de algunos aspectos básicos del sistema dopaminérgico y su papel en la modulación de la ansiedad, por ser el estudio del papel de uno de sus receptores, el D1, en la modulación de la ansiedad el objetivo primario de esta tesis.

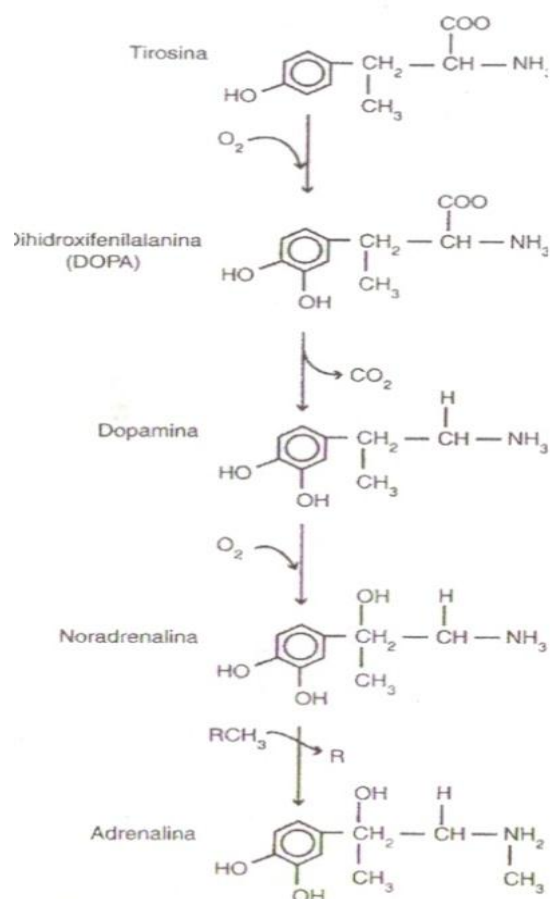


Figura6. Muestra un esquema general de la vía sintética de las catecolaminas. Las catecolaminas se sintetizan a partir de la tirosina la cual, por medio de la enzima tirosina-hidroxilasa, es convertida en dihidroxifenilalanina (DOPA), misma que, mediante la DOPA descarboxilasa, pasa a ser dopamina. La dopamina, a su vez es convertida en noradrenalina por medio de la enzima dopamina β-hidroxilasa y ésta, finalmente, llega a convertirse en adrenalina por acción de la feniletanolamina N- metiltransferasa (Tomado de Contreras et al., 2002).

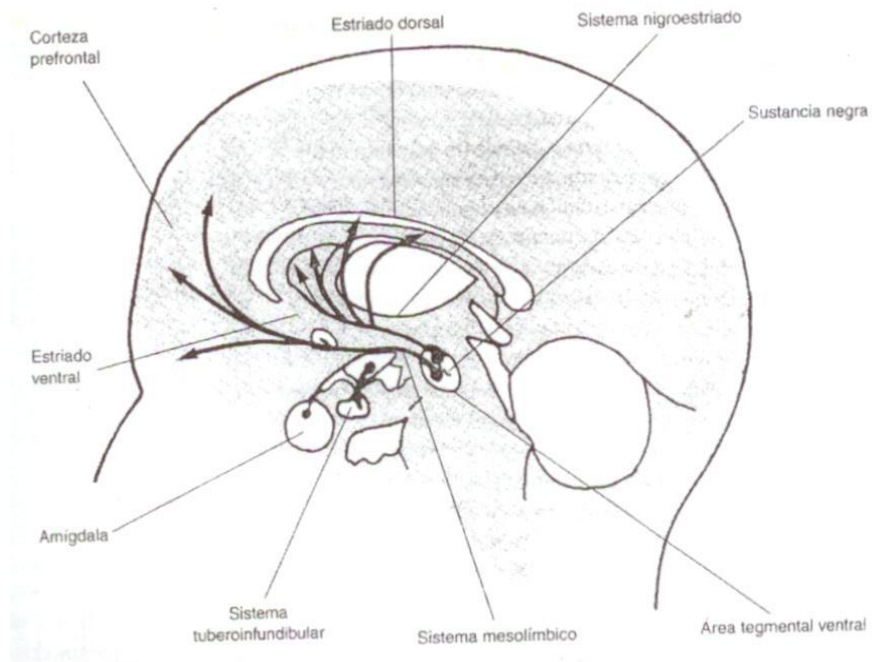


Figura 7. Esquema general que muestra las tres principales vías dopaminérgicas y sus proyecciones hacia algunas estructuras cerebrales involucradas en la emoción y en la motivación (tomado de Contreras et al., 2002).

4.2.1.-Dopamina

La dopamina se sintetiza a partir del aminoácido tirosina, el cual es convertido a L-DOPA por la acción de la tirosina hidroxilasa, en una reacción que es el paso limitante de la síntesis de este neurotransmisor y de todas las catecolaminas, véase figura 6. (La de la síntesis de catecolaminas). La L-DOPA es a su vez convertida en dopamina, por la acción de la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos. La dopamina se metaboliza principalmente a través de la monoamino-oxidasa (MAO) y después por acción de la catecol-O-metil transferasa (COMT), hasta el ácido homovalínico (HVA) cuyos valores en sangre y líquido cefalorraquídeo pueden proporcionar una medida indirecta del recambio de la dopamina (Cooper, 1996).

4.2.2. Liberación de la dopamina

En las terminales dopaminérgicas el neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma de donde puede ser liberada directamente al espacio sináptico o bien ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis.

Liberación por exocitosis.

En este proceso la dopamina contenida en vesículas es liberada al exterior al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica. Este mecanismo está constituido por varias etapas (Cooper,1996). Primeramente las vesículas transportan el neurotransmisor a su interior mediante una proteína transportadora con 12 dominios transmembranales que utiliza un gradiente electroquímico generado por una bomba (ATPasa) de protones (H⁺) (Cooper,1996). La mayor parte de las vesículas sinápticas (~90%) que contienen al neurotransmisor no están libres en el citoplasma sino que se encuentran unidas al citoesqueleto de la terminal presináptica mediante la interacción de proteínas presentes en la membrana de la vesícula (sinapsinas I y II) con proteínas del citoesqueleto. Característicamente las sinapsinas son fosforiladas por diversas cinasas de proteína que incluyen a las cinasas I y II dependientes de iones de Ca²⁺ y de la proteína calmodulina (CaMK I y CaMK II) y por la cinasa dependiente de AMPc (PKA). Cuando un potencial de acción alcanza la terminal nerviosa, el cambio en el potencial de membrana activa a canales de Ca²⁺. Debido al gradiente electroquímico se genera un influjo de iones de Ca²⁺ los que en conjunto con la calmodulina activan a las cinasas CaMK I y CaMK II, las que fosforilan a la sinapsina I (CaMK I y CaMK II) y a la sinapsina II (CaMK II). La adición de un grupo fosfato a las sinapsinas debilita la unión de las vesículas sinápticas al citoesqueleto, facilitando así su transporte a la zona activa.

Una vez transportadas a la zona activa las vesículas se fijan a la misma (anclaje o "docking"), donde experimentan un proceso que las hace competentes para la exocitosis (maduración o "priming"). Como se mencionó antes, la llegada de un potencial de acción despolariza a la terminal llevando su potencial desde -70 mV hasta +20 a +30 mV, lo que permite la apertura de canales de Ca²⁺ sensibles al voltaje, particularmente de aquellos que se abren en el rango de -20 a 0 mV (canales de alto umbral, que incluyen a los tipos L, N, P y Q). La apertura de estos canales permite que en su vecindad se formen zonas de alta densidad ("nubes") de Ca²⁺ donde la concentración llega a ser hasta de 100-200 M, es decir 1000 veces la concentración en reposo (100-200 nM). El aumento de la concentración de Ca²⁺ afecta a diversas proteínas, entre ellas aquellas involucradas en la exocitosis, en un proceso donde una proteína, la sinaptotagmina, parece funcionar como un sensor de Ca²⁺ que termina de manera súbita el proceso de fusión de la vesícula, una vez que se han formado complejos formados por proteínas como la syntaxina, la SNAP-25, el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) y proteínas de unión a NSF o SNAP.

En la sinapsis, la dopamina es inactivada esencialmente por mecanismos de recaptura por parte de las terminales de la neurona presináptica mediante la acción de un transportador selectivo para la dopamina que posee doce dominios transmembranales (Goldman, 2001).

Estudios neuroanatómicos realizados utilizando tanto la técnica de Falck-Hillsarp (Dahlström y Fuxe, 1964) como diversos procedimientos inmunohistoquímicos (Fuxe et al., 1978) han puesto de manifiesto que las neuronas dopaminérgicas se distribuyen en tres sistemas neuronales con propiedades anatómicas y funcionales diferentes (Figura 7): 1) el sistema nigroestriatal que se origina en la sustancia negra (grupo celular A9 de Dahlström y Fuxe, 1964), que envía proyecciones hacia el cuerpo estriado y está involucrado en funciones motoras extrapiramidales, 2) el sistema mesolímbico y el mesocortical, que se originan en el área tegmental ventral (grupo celular A10; de Dahlström y Fuxe, 1964) y cuyas neuronas proyectan hacia estructuras del cerebro anterior como la corteza cerebral, el tubérculo olfatorio, el septum, el núcleo accumbens y la amígdala. Este sistema ha sido involucrado principalmente en funciones cognitivas, en la adicción a drogas psicoactivas, en la motivación y en la ansiedad, así como en la depresión, y 3) el sistema tuberoinfundibular que se origina en el hipotálamo (núcleos arqueado y paraventricular) y proyecta tanto al lóbulo intermedio de la hipófisis como a la eminencia media. Se considera que dicho sistema tiene un papel fundamental en la regulación neuroendocrina (Contreras et al., 2002).

En estudios en los que se ha hecho uso de técnicas inmunohistoquímicas, de hibridación *in situ* y de autoradiografía, se ha observado que la amígdala tiene una distribución rica de receptores dopaminérgicos D₂ y D₁, estando localizados los D₁ en las islas paracapsulares preferentemente y los D₂ en el núcleo central (Boyson et al., 1986).

4.2.3. Tipos de receptores dopaminérgicos

Se han identificado cinco tipos de receptores dopaminérgicos agrupados en dos familias. Los tipo D₁ y los tipo D₂. Ambos receptores se encuentran acoplados a proteínas G e inducen diferentes respuestas en los sistemas de los segundos mensajeros. Los receptores de tipo D₁, a su vez, incluyen a los subtipos D₁, D₃ y D₅. Los receptores D₁ están acoplados a la adenil-ciclasa, a la que estimulan, mientras que los tipo D₂ (subtipos D₂ y D₄) inhiben la actividad de esta enzima (Siegel et al., 1994; Dumbrielle et al., 1985). Los receptores D₂ cuentan con dos variantes, los D₂ (D₂ brazo corto), D_{2L} (D₂ largo), cada uno de estos receptores se encuentra distribuidos de manera diferencial en diversas estructuras cerebrales y poseen características propias que les dan una función específica (Contreras et al., 2002).

4.2.4. Dopamina, amígdala y ansiedad

El área ventral tegmental (VTA) contiene neuronas dopaminérgicas (DA), cuyas aferencias inervan la amígdala basolateral y central, que como ya se mencionó tienen un papel importante en la ansiedad (Oades y Halliday, 1987). Es importante señalar a este respecto, que lesiones del área ventral tegmental con 6-hidroxidopamina disminuyen la concentración de dopamina en la amígdala (Fallon et al.,

1978) y que su estimulación química la incrementa (Hagan et al.,1990). Por otro lado se sabe que el estrés condicionado incrementa el metabolismo de dopamina en los núcleos central y basolateral de la amígdala (Coco et al., 1992) y que neuronas de estos núcleos pueden ser activadas por el miedo despertado por estímulos ambientales (Deutch et al.,1985; Guarraci y Kapp,1999).

Adicionalmente, los receptores dopaminérgicos D1 en la amígdala pueden estar involucrados en la expresión de la potenciación a largo plazo (LTP) (Huang y Kandel, 1996) y estudios donde se ha empleado las respuestas de sobresalto y de congelamiento defensivo, como índices conductuales de miedo y ansiedad, indican que los receptores D1 en la amígdala pueden mediar el condicionamiento al miedo (Greba y Kokkinidis, 2000; Guarraci et al., 1999; Nader y Le Doux,1999; Lamont y Kokkinidis, 1998). Por último, la administración intra-amigdalina de raclopride, un antagonista D2, al igual que el SCH23390, que antagoniza a los receptores D1, bloquea la adquisición y la expresión del sobresalto potenciado por el miedo, a dosis que no afectan ni la reactividad al choque ni su sensibilización (Greba y Kokkinidis, 2000 ; Lamont y Kokkinidis, 1998).

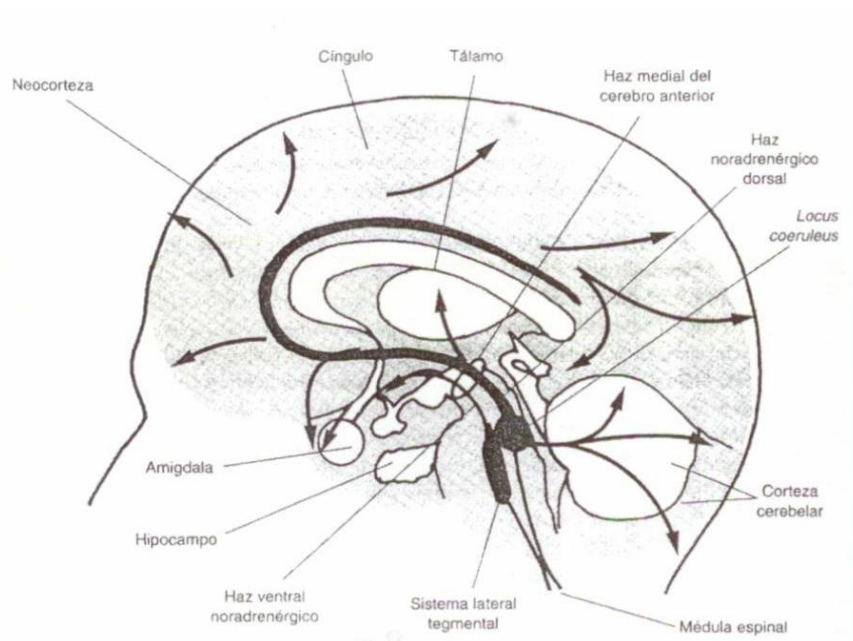


Figura 8. Esquema general que muestra las dos principales vías noradrenérgicas. El locus coeruleus es la principal fuente de fibras noradrenérgicas que proyectan hacia todo el sistema nervioso central (Tomado de Contreras et al., 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

La ansiedad es una de las enfermedades relacionadas con alteraciones en la emoción cuya incidencia en la población mundial va en aumento, de ahí la preocupación existente por establecer algún control sobre ella. Por ello, el estudio de los mecanismos que subyacen su modulación resulta prioritario para entender la forma como esta se altera y adquiere una dimensión patológica, así como para el diseño de fármacos que pudieran restaurar sus niveles normales cuando esta se altera. En el presente trabajo de tesis, mediante microinyecciones bilaterales intra-amigdalinas del SCH23390, un antagonista selectivo para los receptores dopaminérgicos D1, y de la evaluación conductual a través del modelo denominado “prueba de la caja luz-oscuridad”, se ha explorado en la rata el papel que tiene la transmisión dopaminérgica, mediada por sus receptores D1, en la modulación de la ansiedad.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

1.-OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- a) Estudiar a través de la prueba “caja luz-oscuridad” los posibles efectos del SCH23390, sobre la conducta ansiosa cuando este antagonista específico para los receptores D1 es microinyectado en regiones cercanas a la porción rostro lateral de la isla intercalada principal de la amígdala de ratas adultas.
- b) Estudiar bajo las condiciones anteriormente señaladas el efecto del SCH23390 sobre la locomoción de la rata mediante el uso de la prueba “caja luz-oscuridad”.
- c) Estudiar bajo las condiciones anteriormente señaladas el efecto del SCH23390 sobre la locomoción mediante el uso de un “campo abierto”.

2.-HIPOTESIS

a) Hipótesis alterna:

La administración aguda del antagonista dopaminérgico D1 SCH23390 en la porción rostro lateral de la amígdala cerebral de la rata disminuye su ansiedad, en la “caja luz-oscuridad sin afectar su locomoción tanto en dicho paradigma como en la prueba de “campo abierto”.

b) Hipótesis nula:

La administración aguda del antagonista dopaminérgico D1 SCH23390 en la porción rostro lateral de la amígdala cerebral de la rata no tiene ningún efecto sobre la ansiedad cuando esta se mide en ratas utilizando el paradigma “luz-oscuridad” y afecta su locomoción tanto en el paradigma anterior como en la prueba de “campo abierto”.

3. VARIABLES

a) Independiente:

La dosis del fármaco que se administró

- Dosis 0.0 ng SCH23390 (solución salina 0.9%).
- Dosis 30.0 ng SCH23390.
- Dosis 120.0 ng SCH23390.

b) Dependiente:

- Tiempo de latencia para entrar al compartimiento oscuro de la caja “luz oscuridad”.
- Tiempo total de permanencia en espacio iluminado de la caja “luz oscuridad”.
- Tiempo de latencia para entrar al compartimiento iluminado de la caja “luz oscuridad”.
- Tiempo total de permanencia en espacio oscuro de la caja “luz oscuridad”.
- Número de visitas al compartimiento iluminado de la caja “luz oscuridad”.
- Número de transiciones entre los compartimientos de la caja “luz oscuridad”.
- Actividad locomotora en el espacio iluminado de la caja “luz oscuridad”.
- Actividad locomotora en el espacio oscuro de la caja “luz oscuridad”.
- Actividad locomotora en los espacios iluminado y oscuro de la caja “luz oscuridad”.
- Actividad locomotora horizontal en un “campo abierto”.
- Locomoción vertical (“rearing”) en un “campo abierto”.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Sujetos:

Se usaron 54 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 260 ± 10 gramos provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las 54 ratas fueron divididas en 3 grupos de 18 sujetos y alojados todos los sujetos individualmente después de haber sido canulados. Las ratas fueron asimismo mantenidas a una temperatura ambiente de 22°C utilizando un ciclo luz-oscuridad de 12/12 horas (luz prendida a las 6:00 AM), con agua y alimento *ad libitum*.

4.2. Escenario:

El experimento se llevó a cabo en un cuarto conductual sono-amortiguado y equipado con facilidades para la video-grabación de la conducta en forma remota. La manipulación de los animales se realizó en un vivarium, localizado frente al laboratorio en donde se encuentra el cuarto de conducta.

4.3. Materiales

4.4. Manipulación conductual

- Franela
- Cronómetro (ROBIC Sc 505)

4.5. Cirugía Estereotáxica

- Aparato estereotáxico (KOPF Modelo 957, USA)
- 1 frasco de clorhidrato de ketamina
- Cánulas guía (acero inoxidable 0.46 mm. d. e. C315G, Plastic One, Roanoke, USA)
- Mandril para cánula guía (C315DC, Plastic One, Roanoke, USA)
- Acrílico dental (Laboratorios Arias, México D. F., México)
- Benzetacil V Fortificado (20,000 u. i. Laboratorios Fort Dodge Animal Health, S. A. de R.L.)
- Marcador negro
- Tornillos (acero inoxidable)
- Aparato de control de temperatura (CMA /150, Estocolmo Suecia)
- Jeringa para insulina
- Cotonete, algodón, gasa.
- Xylocaína spray
- Jeringa plastipak de 3 cm.
- Micro taladro (modelo 750)
- Chaquira
- Pegamento Kolaloka
- Instrumental de cirugía (bisturí, tijeras, pinza, desarmador pequeño)
- Hoja de rasurar (Guillete)
- Bascula granataria
- Calculadora
- Cajas de plexiglas
- Porta letreros

4.6. Inyección bilateral

- Solución de SCH23390 (30 y120 ng) (Tocris, Ellisville, USA)
- Bomba de microinyección (CMA/100)
- Jeringas de microinyección Hamilton (inyector 0.20 mm. d.e. para microdiálisis. Estocolmo Suecia)
- Solución salina 9%

4.7. Registro de la conducta y calificación

- Videocámara (Panasonic BP144)
- Televisión (12 pulgadas)
- Videocasete 120minutos (SONY)
- 2 Cronómetros (ROBIC SC 505)
- Hojas de calificación (prediseñadas)

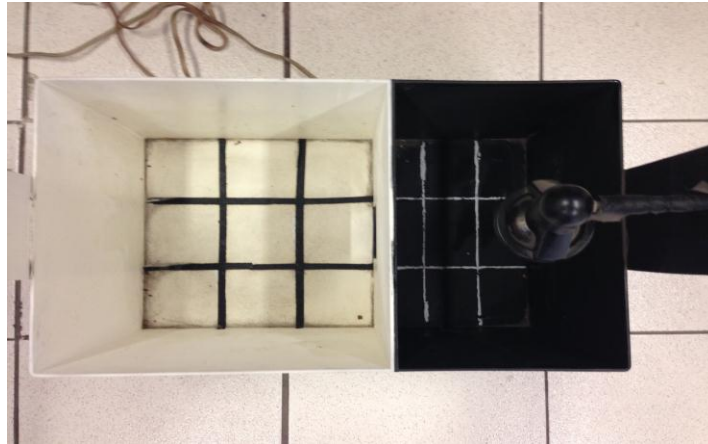


Fotografía 1. Muestra el equipo utilizado en el apartado 4.7 de materiales, este equipo fue utilizado para el registro y calificación de la conducta de la rata en la prueba de la caja “luz oscuridad” en la presente tesis.

4.8. Prueba “caja luz-oscuridad”

- Se utilizó una caja de acrílico dividida en 2 compartimientos que se encontraban conectados entre sí por una abertura de 7x7cm. Tanto las paredes como el piso del compartimento “luminoso” se pintaron de blanco, siendo sus medidas de (27x27x27cm.). El otro compartimiento se pintó de negro, teniendo como medidas (27x18x27cm.).

- En el piso de ambos compartimientos se dibujaron cuadrantes de 9x9 cm usando líneas blancas ó negras para los compartimientos oscuro y luminoso respectivamente. El compartimiento se iluminó con una lámpara de luz blanca fría (700 lux), mientras que una lámpara de luz roja (70 lux) se utilizó para iluminar al compartimiento oscuro (Ramos et al., 1997; Costall et al., 1989; Henniniger et al.,2000).La “caja luz-oscuridad” puede apreciarse en la Fotografía 2.



Fotografía 2. Muestra la “caja luz-oscuridad” hecha de acrílico dividida en 2 compartimientos que se encuentran conectados entre sí por una abertura de 7x7cm. Tanto las paredes como el piso del compartimiento “luminoso” pintados de blanco, siendo sus medidas de (27x27x27cm.). El otro compartimiento pintado de negro, teniendo como medidas (27x18x27cm.) En el piso de ambos compartimientos se observan cuadrantes de 9x9 cm usando líneas blancas o negras para los compartimientos oscuro y luminoso respectivamente. El compartimiento blanco se iluminó con una lámpara de luz blanca fría (700 lux), mientras que una lámpara de luz roja (70 lux) se utilizó para iluminar al compartimiento oscuro.

4.9. Prueba campo abierto

Para esta prueba se utilizó una caja o campo abierto de madera con medidas de (40x40x30 alto) el cual fue dividida en 16 cuadrantes de 10x10 cm. La caja se iluminó durante el experimento con luz tenue (7lux)(Hernández-Gómez et al., 2002).El campo abierto puede apreciarse en la Fotografía 3.



Fotografía 3. Muestra una caja o campo abierto de madera con medidas de (40x40x30 alto) el cual fue dividida en 16 cuadrantes de 10x10 cm. La caja está iluminada con luz tenue (7lux) (Hernández-Gómez et al., 2002).

4.10. Perfusión

- Solución salina al 9%
- Pentobarbitál sódico (Laboratorios Ttokkyo, Mexico city México)
- Jeringa para insulina
- Bomba de perfusión y microinyección (arriba mencionada)
- Paraformaldehído al 4%
- Frascos con formaldehído al 10%
- Guillotina
- Instrumental quirúrgico (tijeras, pinzas, alicata, bisturí)
- Marcador
- Azul de pontiamina (en concentración de 0.01M. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

4.11. Fijación de tejido y cortes

- Sacarosa al 10, 20 Y 30%
- Tissue
- Molde de cerebro
- Críostato (CM1510-3, Leica Instruments, Nussloch, Germany)
- Porta objeto recubiertos con gelatina
- Lápiz con punta de diamante
- charola

4.12. Tinción de tejidos (Técnica de cristal violeta)

- Violeta de cresilo
- Tren de tinción
- Xilol
- Permont (resina)
- Etanol al 100%, 95%, 70%
- Agua

4.13. Localización de coordenadas y implantes de cánulas guía.

- Atlas estereotáxico (Paxinos y Watson, 1986)
- Microscopio Óptico Olympus CH20
- Juego de copias del atlas estereotáxico para indicar la localización de las cánulas.

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Habitación a la manipulación conductual

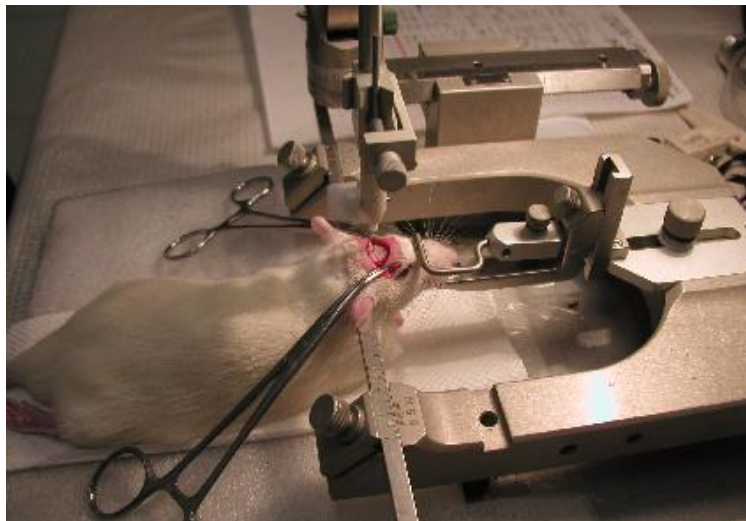
Con el fin de disminuir la ansiedad de los animales producida por la presencia del experimentador, cada sujeto experimental fue manipulado por el investigador durante 5 minutos, una vez al día y durante una semana. La manipulación se realizó sujetando al animal con una franela mientras se le acariciaba. El tiempo del procedimiento se tomó con un cronómetro. Transcurridos los cinco minutos se depositó nuevamente al animal en su caja. Las ratas se utilizaron una sola vez.

Los animales fueron asignados al azar dentro de uno de tres grupos experimentales. Cada grupo estuvo formado por 18 individuos y se le denominó de acuerdo a la sustancia infundida a cada uno de sus miembros: 1) solución salina 2) SCH23390 30 ng y 3) SCH23390 120 ng

5.2. Cirugía estereotáxica

Para el implante permanente de cánulas dentro de la amígdala cerebral, las 54 ratas de todos los grupos experimentales fueron anestesiadas con clorhidrato de ketamina (170 mg/kg, i.p.) y sus oídos se desinfectaron mediante la aplicación de una solución antiséptica. Posteriormente, los sujetos fueron montados y fijados al aparato estereotáxico. A continuación se efectuó una incisión en la piel sobre la superficie del cráneo para descubrir el bregma y se procedió a la implantación de una cánula guía por lado usando las siguientes coordenadas estereotáxicas: antero posterior -1.7; lateral \pm 4.7 y ventral -7.0, a partir de superficie del cráneo, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986).

Una vez colocadas las cánulas bilateralmente se procedió a fijarlas mediante 3 tornillos de relojería que se introdujeron a los huesos del cráneo del animal para posteriormente ser incluidos dentro de un molde de acrílico dental. Dicho molde se preparó mezclando el acrílico con su diluyente hasta formar una pasta de consistencia apropiada que fue depositada sobre las cánulas guía y tenía el objeto de impedir que el animal se pudiera retirar dicho implante. Una vez que el acrílico dental adquirió un consistencia sólida se desmontó al animal del aparato estereotáxico y se le colocaron mandriles en cada una de las cánulas guía para evitar que estas se taparían, manteniendo así la cánulas en perfecto estado para la inyección del fármaco. Durante la cirugía la temperatura del animal se mantuvo a 37 °C., con un aparato de control de temperatura, al finalizar el procedimiento se inyectó 1cm³ de Benzetacil por vía intramuscular para prevenir cualquier infección causada por la cirugía. Una vez terminada la cirugía, las ratas se alojaron en cajas individuales y se transfirieron al vivarium, en donde se dejaron recuperar por un período de siete días.



Fotografía 4. Se muestra el implante permanente de cánulas dentro de la amígdala cerebral. Las ratas fueron colocadas en el aparato estereotáxico que se muestra y se realizó una incisión en la piel sobre la superficie del cráneo para descubrir el bregma e implantar las cánulas guía bilateralmente, usando las siguientes coordenadas estereotáxicas: antero posterior -1.7; lateral \pm 4.7 y ventral -7.0 a partir de superficie del cráneo, de acuerdo al atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1986).

5.3. Microinyección bilateral aguda

Un día antes del experimento se alojaron a los animales en el cuarto de experimentación en donde permanecieron en reposo, sin alimento, pero con agua *ad libitum*, en un intento por reducir diferencias en el nivel de ansiedad basal de las ratas. Al día siguiente se realizó la microinyección bilateral del antagonista SCH233290 a una dosis de 30 y 120 ng o bien solución salina al 0.9 % en lugar

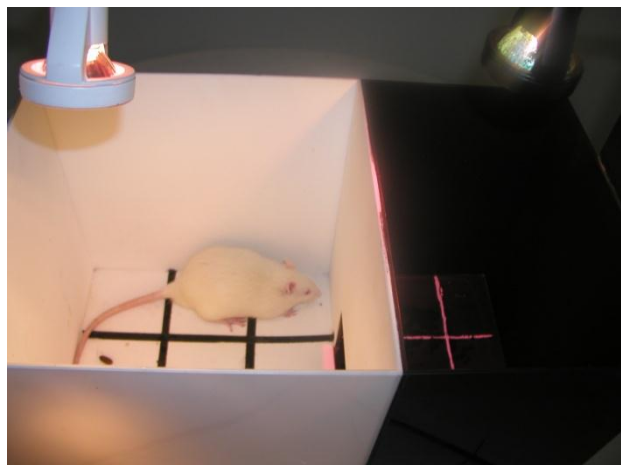
del antagonista. Cabe señalar, que el experimentador permaneció “ciego” a la naturaleza de las inyecciones realizadas. Las inyecciones se aplicaron mediante el uso de dos bombas de microinyección calibradas para inyectar un volumen constante de 0.2 μ l / sitio durante un período de 5 minutos. Las pruebas conductuales se realizaron inmediatamente después de la inyección.

5.4. Registro conductual

La conducta de los animales fue registrada durante 5 minutos, en forma remota dentro de un cuarto sono-amortiguado mediante una videocámara instalada arriba del dispositivo utilizado.

5.4.1. Prueba “caja luz-oscuridad”

Durante la prueba de la “caja luz-oscuridad” una fuente de luz blanca fría (700 lux) fue utilizada para iluminar uno de los compartimentos, el iluminado, mientras que una lámpara de luz roja (70 lux) se utilizó para iluminar el compartimento oscuro. La prueba se inició colocando a la rata en el centro del compartimento iluminado encarando la entrada entre ambos compartimentos y la conducta se video-grabó por 5 minutos. Durante ellos, se registraron como medidas de ansiedad la latencia para entrar al compartimento oscuro, el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado y el número de transiciones entre ambos compartimentos. El número de levantamientos (“rearings”) y el número de líneas cruzadas en cada compartimento fue también registrado como un índice de locomoción vertical y horizontal respectivamente. La caja se limpió después de cada prueba con una solución de jabón neutro y agua (dextran al 5%).



Fotografía 5. Muestrala “caja luz-oscuridad” hecha de acrílico dividida en 2 compartimentos que se encuentran conectados entre sí por una abertura de 7x7cm. Tanto las paredes como el piso del compartimento “luminoso” pintados de

blanco, siendo sus medidas de (27x27x27cm.). El otro compartimiento pintado de negro, teniendo como medidas (27x18x27cm.). En el piso de ambos compartimientos se observan cuadrantes de 9x9 cm usando líneas blancas o negras para los compartimientos oscuro y luminoso respectivamente. El compartimiento blanco se iluminó con una lámpara de luz blanca fría (700 lux), mientras que una lámpara de luz roja (70 lux) se utilizó para iluminar al compartimiento oscuro. También se puede apreciar a la rata en el centro del compartimiento iluminado encarando la entrada entre ambos compartimentos.

5.4.2. Prueba “campo abierto”

Adicionalmente, la locomoción se midió también, después de la prueba “luz-oscuridad”, en el “campo abierto” Para ello el animal fue colocado en una de las esquinas de la caja, dejándose a la rata deambular dentro de ella durante 5 minutos y midiéndose, como índice de locomoción, el número de cuadros que recorrió y el número levantamientos (“rearings”) que realizó. La siguiente fotografía ilustra el campo abierto durante el experimento.



Fotografía 3. Muestra una caja o campo abierto de madera con medidas de (40x40x30 alto) el cual fue dividida en 16 cuadrantes de 10x10 cm. La caja está iluminada con luz tenue (7lux) (Hernández-Gómez et al., 2002). Se observa como el animal fue colocado en una de las esquinas de la caja, dejándose que deambule dentro de ella durante 5 minutos y midiéndose, como índice de locomoción, el número de cuadros que recorrió y el número levantamientos (“rearings”) que realizó.

5.5. Perfundición

Una vez terminadas las pruebas conductuales los animales fueron perfundidos tras ser anestesiados con 0.6 ml. de Pentobarbitál sódico. Para ello, se le inyectó al animal intracardialmente 250 ml. de solución salina al 0.9% seguida de 250 ml. de paraformaldeido al 4.0 % en un buffer de fosfatos 0.1M con un pH de 7.6. Los cerebros se removieron y fueron post-fijados en una solución de formaldehído al 10% por 1 o dos semanas para luego ser crio-protegidos en sacarosa al 10%, 20% y 30% durante un día en cada una de las concentraciones señaladas.

5.6. Localización de cánulas:

Para la localización de las puntas de las cánulas implantadas, una vez anestesiadas las ratas, pero antes de la perfundición, se procedió a microinyectar una solución de azul de pontamina (0.01M) bajo los parámetros usados en el caso de la inyección del SCH23390.

5.7. Corte y montaje de tejido:

Una vez crioprottegidos en las concentraciones de sacarosa señaladas, los cerebros se rebanaron coronalmente con un criostato y las secciones obtenidas (40µm) se montaron en porta objetos cubiertos con gelatina (Sigma)

5.8. Tinción de Nissl (Cristal violeta)

Las secciones de amígdala, depositadas en porta-objetos, como se indicó anteriormente, se dejaron secar por 1 o 2 días para después ser teñidas utilizando un tren de tinción. Los porta-objetos acomodados en canastillas fueron sumergidos en cada una de las soluciones que continuación se indican:

- *Agua (2minutos)
- *Etanol 70%
- *Etanol70%
- *Etanol 95%
- *Etanol95%
- *Etanol 100%
- *Etanol100%
- *Etanol 95%
- *Etanol95%
- *Etanol 70%
- *Etanol 70%

Violeta de cresilo (1-4 minutos) variable dependiendo del tiempo de preparación del colorante.

*Agua (2 minutos)
*Agua (2 minutos)

Repetir :

*Agua (2 minutos)
*Etanol 70%
*Etanol 70%
*Etanol 95%
*Etanol 95%
*Etanol 100%
*Etanol 100%

Continuar con:

*Xilol (2 minutos)
*Xilol (2 minutos)

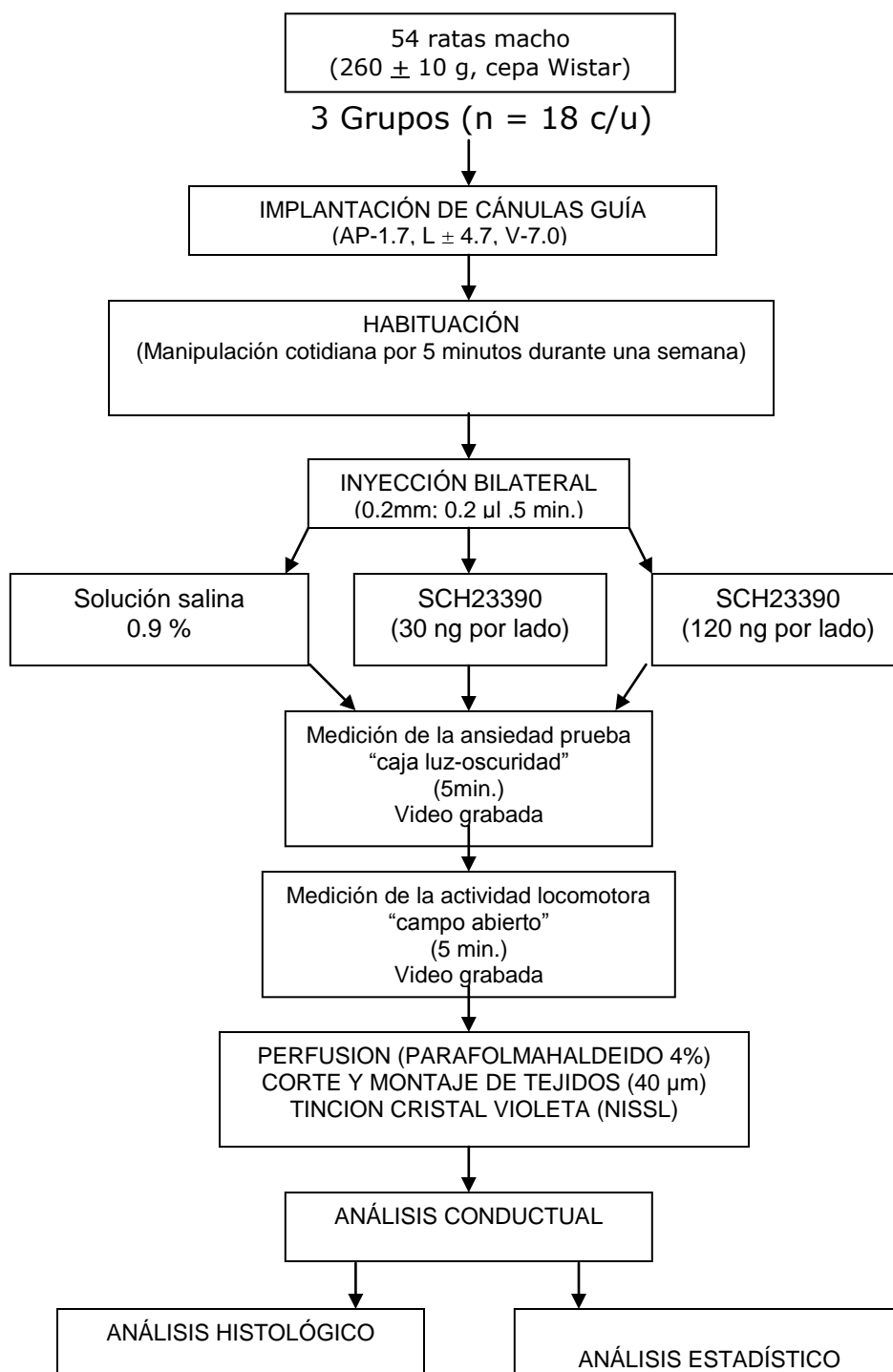
Montaje con Permont.

5.9. Análisis Histológico:

Con la ayuda de un microscopio óptico se localizó el sitio de inyección descartándose todos aquellos animales en los que la punta de la cánula se encontró fuera del sitio de interés (porción rostro lateral de la amígdala).

5.10. Diseño experimental

METODO:



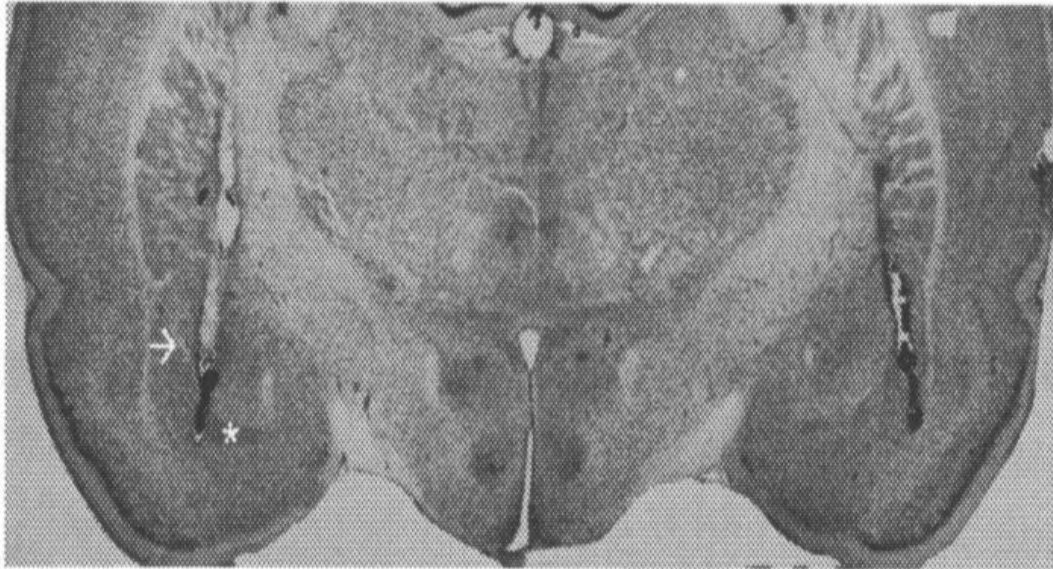
5.12. Análisis estadístico:

En vista de la dispersión de los resultados inherentes a todas las pruebas conductuales y debido a que en algunos casos, en alguno de los grupos, las medidas correspondientes al número de transiciones entre compartimientos y la actividad locomotora en el espacio oscuro de la caja usada no pasaron la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se prefirió utilizar estadística no paramétrica para el análisis de los resultados. Por consiguiente los resultados se expresan en medianas con sus respectivos rangos intercuartiles. Para el análisis de varianza se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y cuando el análisis de varianza arrojó diferencias significativas en las mediciones observadas se utilizó la prueba de Dunn, como prueba post-hoc. En ella se hizo la comparación entre los grupos tratados y el control (solución salina 0.9%) con el fin de conocer el grupo responsable de estas diferencias. Dado que una situación esencialmente similar fue observada cuando se utilizaron pruebas paramétricas para el análisis de los resultados en la Tabla 3,4 se indican adicionalmente los promedios \pm error estándar de la media (E.E.M.) y los porcentajes de variación de cada grupo con respecto a sus controles (0 SCH23390) respectivos. El nivel de significancia aceptado fue considerado $p < 0.05$. Las pruebas estadísticas fueron realizadas usando el programa estadístico Prisma 4 GraphPad (Halmilton, 2003).

V. RESULTADOS

1. VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA

Tras el análisis histológico de los cerebros se consideraron únicamente 38 animales para el análisis estadístico. En dichos animales las cánulas implantadas se ubicaron en la porción rostral de la amígdala cerebral, entre los niveles bregma -1.8 y bregma -2.56 mm de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). En la figura 9A, se presenta un corte coronal representativo que muestra la ubicación de ambas cánulas en el área rostro-lateral de la amígdala. Para este estudio se tomaron en cuenta solamente aquellos animales que tenían ambas cánulas en la amígdala y al menos la punta de una de ellas muy cercana o en la porción rostralateral de la isla intercalada principal. La localización de los sitios de inyección se representa esquemáticamente en la Figura 9B. No fueron tomados en cuenta 16 animales debido a que durante la recuperación pos quirúrgica, ocho de ellos se retiraron el implante, 4 sufrieron una infección en el sitio del implante y en los otros cuatro restantes fue imposible determinar el sitio exacto de la posición de alguna de las dos cánulas dentro de la amígdala.



(A)

Figura 9A. Sección representativa de la amígdala en el nivel de Bregma -1.2 , en donde se observan los tractos dejados por la colocación bilateral de cánulas e inyectores en la amígdala. El asterisco y la flecha blanca indican respectivamente la porción rostro-lateral de la isla intercalada principal y el espacio paracapsular, sitio en donde se localizan las islas intercaladas paracapsulares.

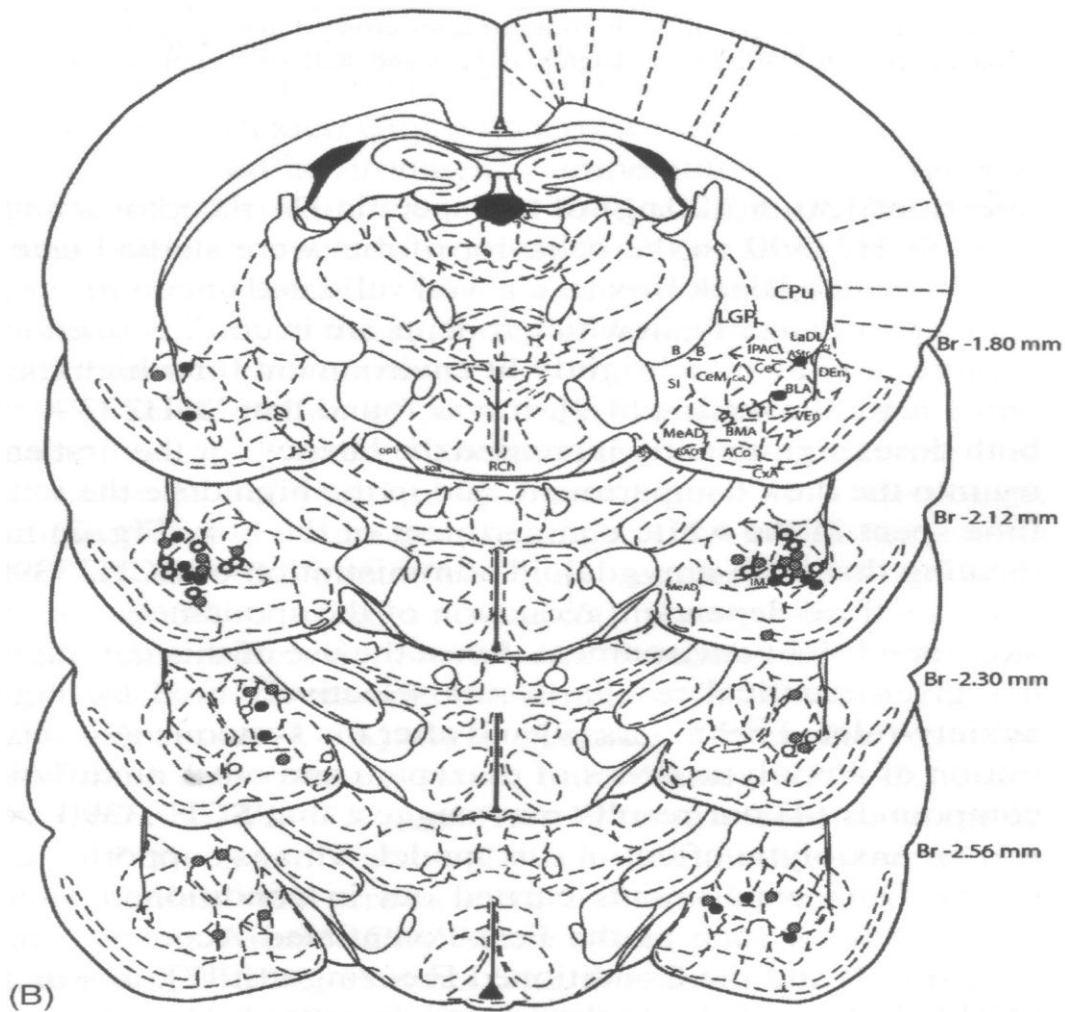


Figura 9B. Secciones representativas de la amígdala entre los niveles Bregma – 1.8 y Bregma-2.56 (Paxinos y Watson, 1986) en las que se muestra en forma esquemática la localización de los sitios de inyección dentro de la amígdala. En algunas ocasiones los sitios de inyección se encuentran sobrepuestos. Círculos abiertos: control; círculos grises 30 ng SCH23390; círculos negros 120 ng SCH23390.

Abreviaturas: Aco: núcleo cortical anterior amigdalóide; B: núcleo basal de Meynert; BAOT: cama del núcleo del tracto accesorio olfatorio; BLA: núcleo basolateral amigdalóide; BMA: núcleo baso medial amigdalóide; CeC: división núcleo central lateral, capsular; CeM: división núcleo central medial; Cpu: núcleo caudado - putamen; CxA: zona de transición de la corteza- amígdala; Den: núcleo dorsal endopiriforme ; I : núcleo intercalado amigdalóide; IM: Núcleo intercalado principal amigdalóide; LaDL: núcleo amigdalóide lateral, dorsolateral; LGP: globo pálido; MeAD: núcleo amigdalóide medial, dorsal; opt: tracto óptico; Rch: área retro- quiasmática; SI: sustancia innominada; sox: decusación supra-óptica y Ven: núcleo ventral endopiriforme.

2. EFECTOS CONDUCTUALES: CAJA LUZ OSCURIDAD

2.1. Efectos de la microinyección bilateral del SCH23390 sobre la conducta de la rata en la prueba “caja luz oscuridad”

En el presente estudio se consideraron principalmente como índices de ansiedad: la latencia de la rata para la entrar por primera vez al compartimiento oscuro, el tiempo total de permanencia en el espacio iluminado y el número de transiciones entre los dos compartimientos, estas últimas contabilizadas como la entrada del animal al compartimiento oscuro y su salida de él al compartimiento iluminado. El número de elongaciones del animal del compartimiento oscuro al iluminado fue tomado como una medida potencial de evaluación del riesgo.

2.2. Latencia para entrar al compartimiento oscuro de la caja “luz-oscuridad”

El tratamiento con SCH23390 indujo un aumento significativo en la latencia para entrar al compartimiento oscuro cuando las ratas fueron inicialmente colocadas en el compartimiento iluminado ($H_{2,35}=10.08$, $p < 0.05$; Fig. 10, Tabla 3). Dicho efecto se observó tras el tratamiento de los animales con 30 ng de SCH23390 por lado y no se modificó cuando se utilizó una dosis más alta (120 ng/lado) del antagonista.

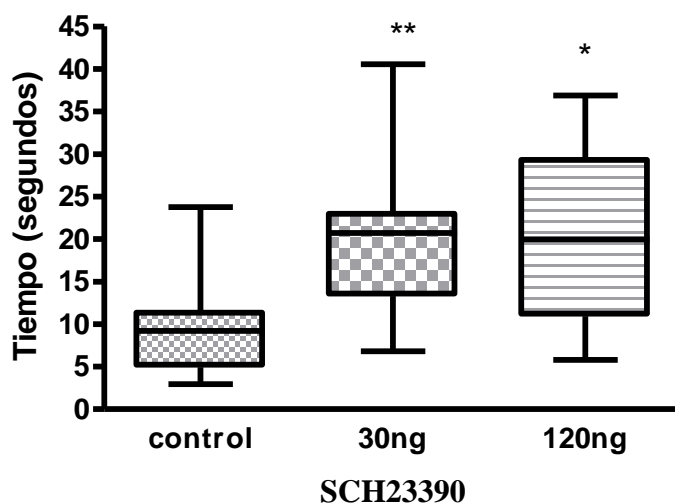


Figura 10. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre la latencia para entrar por primera vez al compartimiento oscuro de la caja “luz-oscuridad”. La administración bilateral intra-amigdaloides de SCH23390 incremento significativamente ($H_{2,35}=10.08$, $p < 0.05$) la latencia para la entrada de las ratas al compartimiento oscuro de la caja “luz-oscuridad”. Los resultados se expresan en segundos como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las líneas por afuera de las cajas (“whiskers”) indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. Los asteriscos indican el nivel de significancia estadística encontrada en la prueba de Dunn con respecto al grupo no tratado (control) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. N =(0 ng/lado,12; 30 ng/lado, 16; 120 ng/lado, 10).

2.3. Tiempo de permanencia en el compartimento iluminado de la caja “luz-oscuridad”

Como puede observarse en la Figura 11, la administración bilateral intra-amigdaloides de SCH23390 (30 y 120 ng/lado) incrementó en forma dosis respuesta ($H_{2,35}=6.08$; $p < 0.05$) el tiempo total que las ratas permanecieron en el compartimento iluminado de la caja con respecto al grupo no tratado (control). Dicho efecto resultó, sin embargo, únicamente significativo cuando se comparó el control con la dosis más alta del antagonista.

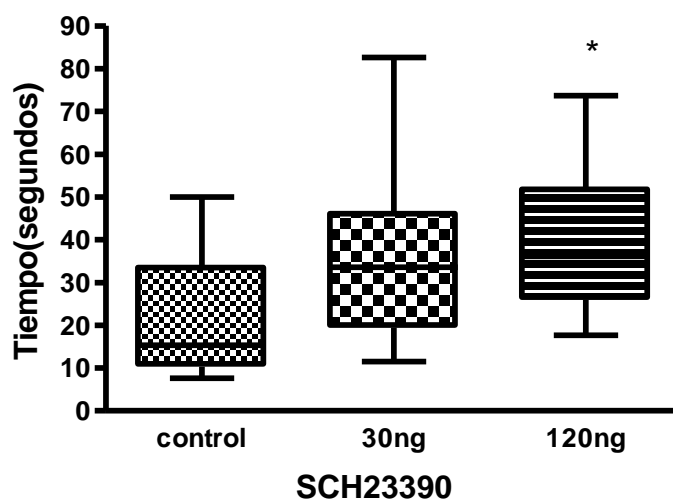


Figura 11. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado de la caja “luz-oscuridad”. El tratamiento bilateral intra-amigdaloides de SCH23390 incrementó el tiempo total de permanencia en el compartimento iluminado de la caja “luz-oscuridad”. Los resultados se expresan en segundos como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las líneas por afuera de las cajas (“whiskers”) indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. El asterisco indica el nivel de significancia estadística encontrada en la prueba de Dunn con respecto al grupo no tratado (control), $*p < 0.05$.

2.4. Número de transiciones entre los compartimientos de la caja “luz oscuridad” (número de visitas al espacio oscuro).

No se encontraron diferencias significativas ($H_{2,35} = 0.35$; $P > 0.05$) en el número de transiciones cuando se compararon los grupos que recibieron bilateralmente SCH23390 (30 y 120 ng /lado) con respecto al grupo no tratado (control)(Figura 12, Tabla 3).

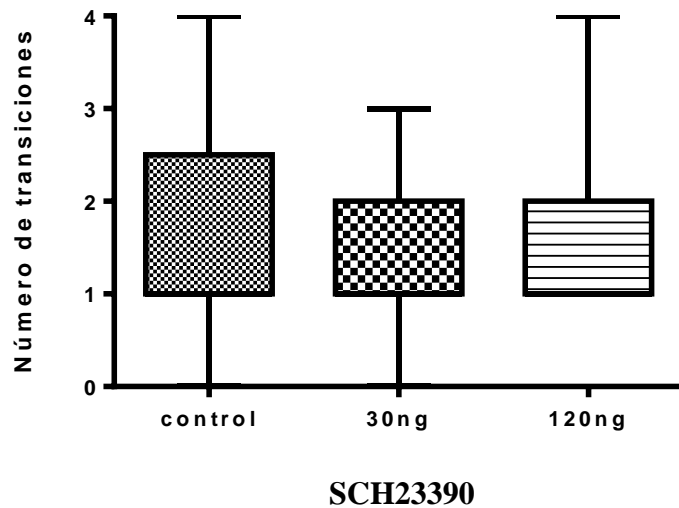


Figura 12. Efecto de la inyección bilateral intra-amigdalina del SCH23390 sobre el número de transiciones entre los compartimientos de la caja “Luz-Oscuridad”. El tratamiento bilateral intra-amigdalino con SCH23390 no tuvo efecto sobre este parámetro. Los resultados se expresan como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las líneas por afuera de las cajas (“whiskers”) indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra.

2.5. Número de elongaciones desde el compartimiento oscuro hacia el iluminado de la caja “luz-oscuridad”

Como se muestra en la (Figura 13, Tabla 3), aunque el tratamiento con SCH23390, en ambas dosis administradas (30 y 120 ng/lado), indujo una disminución similar en el número de elongaciones de la rata, desde el espacio oscuro al iluminado, en comparación con el grupo no tratado (control) dichos efectos no resultaron significativos desde el punto de vista estadístico.

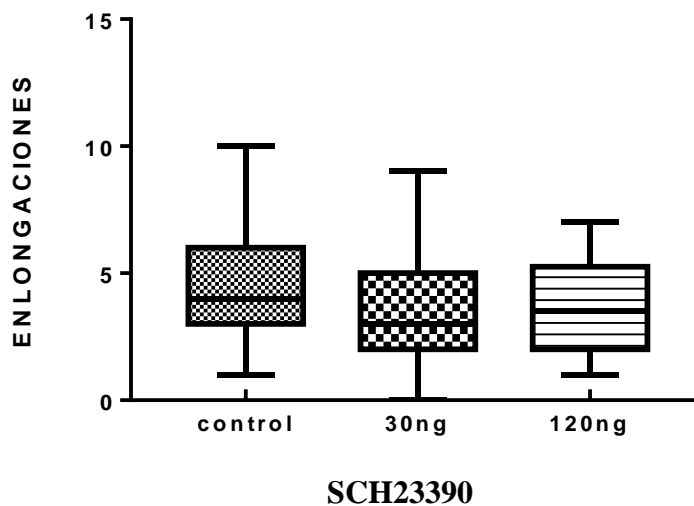


Figura13. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre el número de elongaciones entre los compartimentos de la caja “Luz-Oscuridad”. No se observaron efectos significativos en el número de elongaciones de la rata desde el compartimiento oscuro al iluminado de la caja “luz-oscuridad” Los resultados se expresan como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las líneas por afuera de las cajas (“whiskers”) indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. Los resultados se observan en la Tabla 3.

A continuación se presenta un resumen (tabla 3) de los resultados obtenidos en la prueba “caja luz-oscuridad”, tanto para variables consideradas principalmente como índices de ansiedad, así como para variables adicionales. Adicionalmente se presentan los resultados de las comparaciones estadísticas.

Tabla 3. Efectos de la microinyección amigdalina de SCH23390 sobre la conducta de las ratas en la prueba “caja luz-oscuridad”.

	Control (salina) (n=12)	SCH23390 30ng (n=16)	SCH23390 120ng (n=10)	Prueba Kruskal- Wallis
Latencia para entrar al espacio oscuro (seg.)	9.8 ± 1.8	20.1 ± 2.16	20.9 ± 3.22	H _{2,35} =10.08, p ≤ 0.05
Latencia para entrar al espacio iluminado (seg.)	134.6 ± 38.6	150.6 ± 27.7	114.9 ± 37.1	H _{2,35} =0.09, p ≥ 0.05
Tiempo total de permanencia en espacio iluminado (seg.)	20.3 ± 4.3	34.0 ± 4.0	38.9 ± 5.2	H _{2,35} =6.08, p ≤ 0.05
Tiempo total de permanencia en espacio oscuro (seg)	273 ± 4.6	252 ± 10.5	247 ± 11.1	H _{2,35} =3.72, p ≥ 0.05
Número de elongaciones	4.50 ± 0.7	3.75 ± 0.6	3.60 ± 0.6	H _{2,35} =0.63, p ≤ 0.05
Número de visitas al espacio oscuro	1.69 ± 0.3	1.37 ± 0.2	3.60 ± 0.6	H _{2,35} =0.63, p ≤ 0.05
Número de visitas al espacio iluminado	1.30 ± 0.3	1.12 ± 0.3	1.20 ± 0.3	H _{2,35} =0.49, p ≥ 0.05

Los resultados se expresan como medias ± E.E.M.

3. EFECTOS CONDUCTUALES: LOCOMOCIÓN

La condición motora de los animales, tanto de los controles como los tratados, se evaluó dentro de la “caja luz-oscuridad” midiendo, de la manera como se indicó en la sección de métodos, su locomoción, tanto en el compartimiento iluminado como en el compartimiento oscuro. Adicionalmente, utilizando un “campo abierto” se obtuvo una nueva medida de su actividad locomotora.

3.1. Locomoción en la “caja luz-oscuridad”

A. Compartimiento iluminado.

Como puede observarse en la Figura 14 y en la Tabla 4, el tratamiento bilateral intra-amigdalino con SCH23390 produjo una tendencia dosis-dependiente, pero no significativa estadísticamente ($H_{2,35}=1.44$; $p > 0.05$) para un aumento en la locomoción de los animales dentro de este compartimiento con respecto al grupo no tratado (Control).

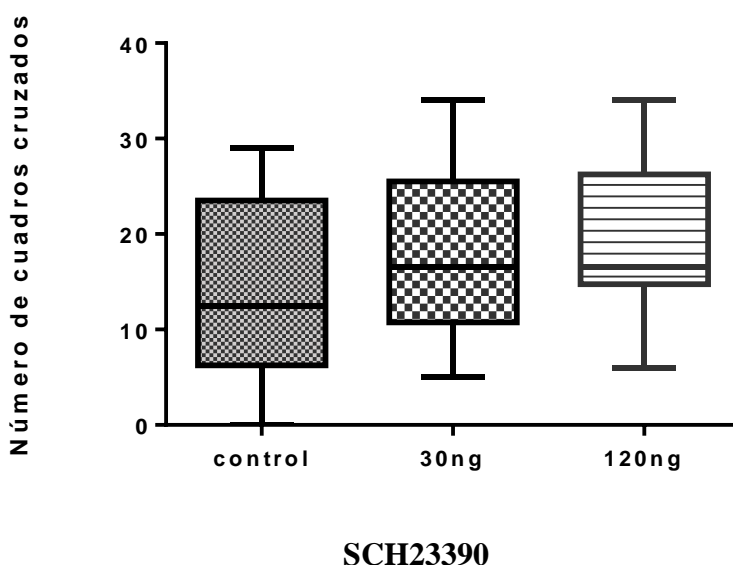


Figura 14. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre la actividad locomotora en el espacio iluminado de la caja “luz-oscuridad”. Obsérvese que la administración bilateral de SCH23390 produjo una tendencia para incrementar la locomoción de las ratas en el espacio iluminado de este paradigma con relación al grupo no tratado (control). Los resultados se representan como el número de líneas cruzadas en dicho compartimiento durante el tiempo total de la prueba y se expresan como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las barras (whiskers) indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. Véase la Tabla 4, para consultar las medias \pm su error estándar para los valores absolutos junto con su cambio porcentual.

B. Compartimiento oscuro

A diferencia de lo ocurrido en los espacios iluminados el SCH23390 produjo una tendencia dependiente de la dosis hacia una baja en la locomoción de los animales en este compartimiento (Figura 15, Tabla 4). Sin embargo, como sucedió en el compartimiento iluminado dicho cambio tampoco resultó estadísticamente significativo ($H_{2,35}=0.2762$; $p > 0.05$).

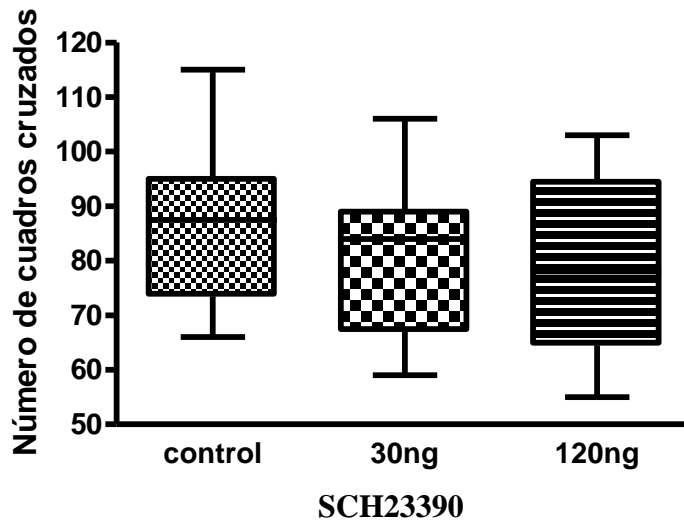


Figura 15. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre la actividad locomotora en el espacio oscuro de la caja “luz-oscuridad”. El SCH23390 administrado bilateralmente en la amígdala indujo una ligera disminución en la locomoción de las ratas en este compartimiento. Los resultados se indican como el número de cuadros cruzados en dicho compartimiento durante la duración de la prueba y se expresan como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las barras indican los valores (whiskers) más altos y bajos dentro de cada muestra. Véase la Tabla 4, para consultar las medias \pm su error estándar para los valores absolutos junto con su cambio porcentual.

C. Compartimiento iluminado +compartimiento oscuro

Como puede verse en la Figura16 y en la Tabla 4, en congruencia con los resultados de la locomoción reportados en cada compartimiento por separado de la caja “luz-oscuridad”, el SCH23390 no tuvo ningún efecto sobre la locomoción de los animales en la totalidad del área de la “caja luz-oscuridad ($H_{2,35} = 0.276$).

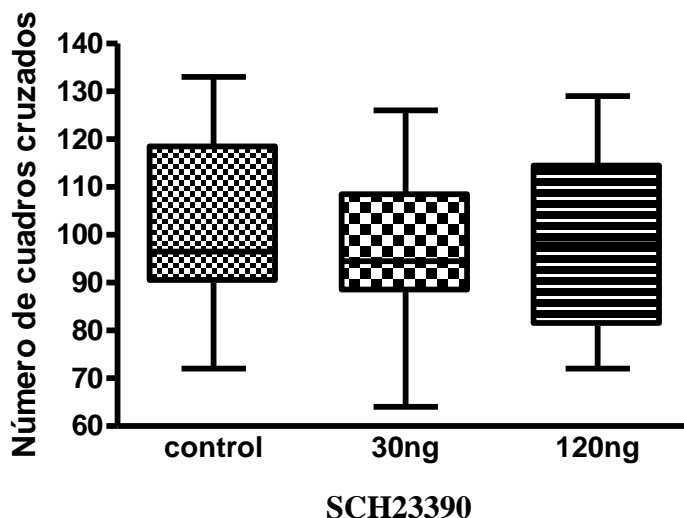


Figura 16. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre la actividad locomotora en los espacios iluminado + oscuro de la caja “luz-oscuridad”. Obsérvese la falta de efectos del tratamiento bilateral con SCH23390 sobre la locomoción de las ratas en el área total de la caja en relación al grupo no tratado (control). Los resultados se representan en líneas cruzadas en dicho compartimento durante el tiempo total de la prueba y se expresan como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las barras indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. Véase la Tabla 4, para consultar las medias \pm su error estándar para los valores absolutos junto con su cambio porcentual.

3.2. Campo abierto

A. Locomoción horizontal

En línea con los efectos observados en la caja “luz-oscuridad”, la locomoción horizontal (Figura 17, Tabla 4) de las ratas tratadas, con respecto al grupo no tratado (control), no fue afectada cuando esta se midió en la prueba de “campo abierto”, pues aunque se observó que las ratas presentaron una tendencia para disminuir su locomoción horizontal con ambas dosis de SCH23390 esta no fue estadísticamente significativa ($H_{2,35}=2.75$, $p > 0.05$ y $H_{2,35}=8.66$, $p < 0.05$).

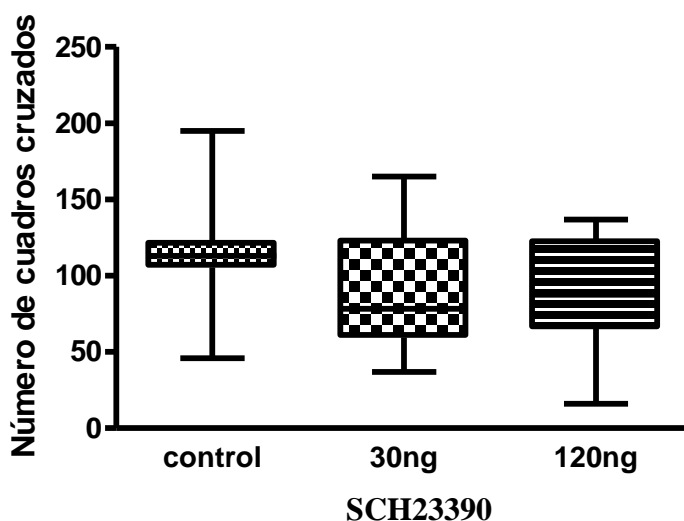


Figura 17. Efecto de la inyección intra-amigdalina del SCH23390 sobre la actividad locomotora horizontal en la prueba de “campo abierto”. Aunque los animales tratados con ambas dosis de SCH23390 tendieron a disminuir su locomoción horizontal con respecto al grupo no tratado (control), los resultados no resultaron significativos. Los resultados se representan como el número de cuadros cruzados durante el tiempo total de la prueba y se expresan como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las barras indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. Véase la Tabla 4, para consultar

las medias \pm su error estándar para los valores absolutos junto con su cambio porcentual.

B. Locomoción vertical (“rearings”)

De la misma manera que ocurrió con la locomoción horizontal el número de levantamientos (“rearings”) de los animales en esta prueba (Fig. 18, Tabla 4), aunque tendió a disminuir con el tratamiento de SCH23390, no resultaron estadísticamente significativos con respecto a su control ($H_{2,35}=8.66$ $p < 0.05$).

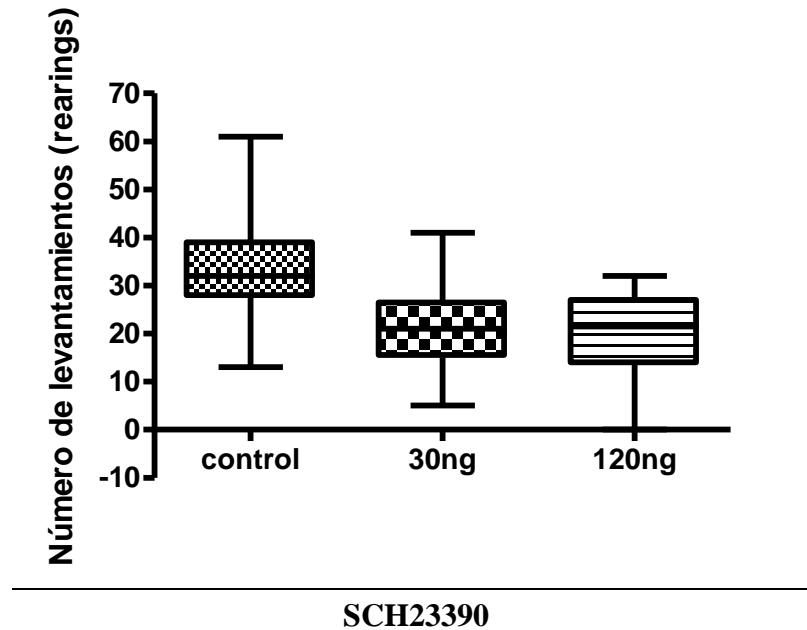


Figura 18. Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la locomoción vertical en la prueba de “campo abierto”. Obsérvese una disminución en el número de levantamientos (“rearings”) tras el tratamiento de los animales con ambas dosis de SCH23390. Estadísticamente los resultados no resultaron significativos con respecto al control. Los resultados se expresan en número de levantamientos (rearings) durante el tiempo total de la prueba como medianas con sus respectivos rangos intercuartiles (cajas). Las barras indican los valores más altos y bajos dentro de cada muestra. Véase Tabla4.

A continuación se presenta un resumen (tabla 4) de los resultados obtenidos en la prueba de la caja de luz-oscuridad y de campo abierto para las variables consideradas principalmente como índices de locomoción. De igual forma se presentan los resultados de las comparaciones estadísticas.

Tabla 4. Efectos de la microinyección amigdalina de SCH23390 sobre la locomoción de las ratas tanto en la en la prueba “luz-oscuridad y campo abierto”.

	Control (salina) (n=12)	SCH23390 30ng (n=16)	SCH23390 120ng (n=10)	Prueba Kruskal- Wallis
Caja luz oscuridad				
Compartimento iluminado (cruces)	14.0 ±2.7	17.1±2.3	18.9±2.5	H2,35=1.38, P ≥0.05
Compartimento oscuro (cruces.)	86.3±4.0	79.5±3.5	78.9±5.1	H2,35=1.84, P ≥0.05
Compartimento iluminado + oscuro	101.0 ±5.3	96.6±4.0	97.8±5.7	H2,35=2.76, P ≥0.05
Prueba Campo abierto				
Locomoción horizontal	115.0 ±10.0	89.0 ±9.2	89.2±11.6	H2,35=2.75, P ≥0.05
Locomoción vertical (Rearings)	33.4±3.2	22.0±2.7	19.8±2.8	H2,35=2.75, P ≥0.05

Los resultados se expresan como medias ± E.E.M.

VI. DISCUSION

En trabajos publicados provenientes de otros laboratorios ha sido reportado que la inyección intra-amigdaloides bilateral de 3 y 2 µg por lado del antagonista específico para receptores dopaminérgicos D1 denominado SCH23390 causa una reducción del sobresalto potenciado por el miedo (Lamont y Kokkinidis, 1998) y del “congelamiento condicionado” (Guarraci et al., 1999), respectivamente. En este trabajo, con objeto de evitar una pérdida en la especificidad y de mantener sus efectos restringidos a su sitio de inyección, para evaluar los efectos del SCH23390 sobre la ansiedad, se empleó una dosis más baja (30 y 120 ng) que la reportada en los estudios señalados. Aunque es difícil establecer comparaciones, vale la pena mencionar que el ID₅₀ del SCH23390 para la inhibición de la vasodilatación renal inducida por dopamina es de 1.13 µg, cuando este compuesto es inyectado dentro de la arteria renal de perros anestesiados (Barnett et al., 1986), un valor más cercano a la dosis empleada por nosotros que la usada por Lamont y Kokkinidis (1998) y Guarraci y colaboradores (1999).

De esta manera, los efectos de la inyección bilateral intra-amigdaloides (30 y 120 ng) del antagonista específico para el receptor D1, el SCH23390, fue estudiado en la conducta mostrada por las ratas en la prueba de la “caja luz-oscuridad”, un paradigma incondicionado ampliamente validado para evaluar los niveles de ansiedad en los roedores y en el cual se explota la aversión que sienten estos por los espacios abiertos y bien iluminados (Costall et al., 1989; Henniniger et al., 2000).

En el presente trabajo, se encontró que ambas dosis de SCH23390 (30 y 120 ng), incrementaron significativamente la latencia para la primera entrada dentro del compartimiento oscuro de la caja “luz-oscuridad” (Figura 10, Tabla 3.) y que a dosis de 120 ng aumentó significativamente el tiempo total de permanencia en el compartimiento iluminado de dicha caja (Figura 10, Tabla 3). En concordancia con los cambios anteriores, aunque los resultados no resultaron estadísticamente significativos con respecto al control, tanto el tiempo de permanencia en los espacios iluminados de la caja, con ambas dosis del SCH23390 (Figura 11, Tabla 3) como la latencia para reingresar al compartimiento iluminado disminuyeron (Tabla 3). Los resultados tomados en su conjunto sugieren que la administración intra-amigdalina de SCH23390 causa una reducción de la aversión espontánea de las ratas para los ambientes brillantes.

Dado, que el uso de este paradigma ha dado resultados opuestos en ratas que selectivamente han sido cruzadas para mostrar conductas de ansiedad (Henniniger et al., 2000) y similares después de la administración sistémica de diazepam y otros compuestos ansiolíticos (Costall et al., 1989, Pérez de la Mora, observaciones no publicadas), nuestros resultados podrían sugerir que el SCH23390 ejerce una acción ansiolítica en este modelo.

Aunque la disminución de la latencia para reentrar al compartimiento iluminado de la caja “luz-oscuridad” (Tabla 3) y del tiempo que la rata permanece en el compartimiento oscuro (Tabla 3) no fueron estadísticamente significativos, debido muy probablemente a la variabilidad experimental inherente al uso de este tipo de paradigmas y sobre todo al hecho de que al pasar la rata la mayor parte del tiempo en el compartimiento oscuro una pequeña disminución de esta tendencia hace muy difícil la obtención de significancias estadísticas. Dicha situación, se hace también aparente en la pequeña disminución que se observa en el tiempo que la rata permanece en el compartimiento oscuro de la caja (Figura 13, Tabla 3) y que refleja el incremento en el tiempo de permanencia del animal en el compartimiento iluminado (Figura 10. Tabla 3).

Nuestra conclusión es apoyada por experimentos llevados a cabo en modelos de ansiedad condicionados, tales como la prueba del “sobresalto acústico potenciado por el miedo” (Lamont y Kokkinidis, 1998) y el “congelamiento condicionado” (Guarraci et al., 1999), en los cuales el SCH23390 inyectado dentro de la amígdala causa una reducción en diferentes índices de ansiedad. Sin embargo, hay que señalar que Rodgers et al. (1994) y Bartoszky (1998), no encontraron efectos claros o ninguno sobre la ansiedad después de la administración sistémica de SCH23390 usando el “laberinto en forma de +” o el paradigma de vocalización

ultrasónica respectivamente. Por otro lado, Simon et al. (1992) mostraron que el SCH23390 administrado sistémicamente 30 minutos antes del uso de la prueba “luz-oscuridad” reduce, como en nuestros experimentos (Figura 10, Tabla 3) la aversión espontánea de los ratones por un ambiente iluminado, acortando la latencia para entrar al compartimiento iluminado cuando dichos animales son inicialmente colocados en el compartimiento oscuro de la prueba de la caja “luz-oscuridad”.

La posibilidad de que los efectos ansiolíticos del SCH23390 fueran el resultado de una interferencia con la actividad motora de las ratas parece poco probable, ya que aunque hay una pequeña disminución en su locomoción en la prueba del “campo abierto” (Figura 17, 18 Tabla 4), los efectos no fueron estadísticamente significativos y la locomoción total del animal en la caja “Luz-Oscuridad” (locomoción en el compartimiento iluminado + en el compartimiento oscuro) (Figura 16, Tabla 4) no se modificó. De hecho, en nuestros experimentos se observó una tendencia a la alta en la locomoción dentro del compartimiento iluminado de la caja (Figura 14, Tabla 4), similar a la que ha sido reportada para los efectos de otras drogas ansiolíticas (Costall et al., 1989). Más aún, ha sido mostrado, usando la caja “luz-oscuridad”, que a pesar de una reducción de la actividad locomotora, inducida por la administración sistémica de SCH23390, la latencia para la primera entrada al compartimiento iluminado cuando la rata es inicialmente colocada en el compartimiento oscuro, es acortada, indicando que las ratas no están impedidas en sus movimientos dentro de la caja (Simón et al., 1992).

La isla intercalada principal y las islas intercaladas paracapsulares son ricas en receptores dopaminérgicos D1 en comparación con los otros núcleos amigdalinos (Scibilia et al., 1992). Más aún, experimentos recientes realizados por Fuxe et al. (2003), han mostrado que la porción rostral lateral de la isla intercalada principal y las islas intercaladas paracapsulares están densamente inervadas por terminales dopaminérgicas. En nuestros experimentos la mayoría de las posiciones de las puntas de las cánulas estuvieron en la vecindad de la porción rostral lateral de la isla intercalada principal y / o de las islas intercaladas paracapsulares (Fig. 9 B).

En consecuencia, debido a que bajo las condiciones empleadas ha sido reportado que la difusión de drogas inyectadas dentro del cerebro es muy limitada y tienden a permanecer en el sitio de su inyección (Peterson, 1988; Pérez de la Mora et al., 2006), es muy posible, que el antagonista SCH23390 haya ejercido sus efectos en cercanía a la porción rostral lateral de la isla intercalada principal y las islas intercaladas paracapsulares. Podría sugerirse entonces, que el SCH23390 ejerce su efecto bloqueando la transmisión dopaminérgica mediada por receptores D1 a nivel de la porción rostral de la isla intercalada principal y de las islas intercaladas paracapsulares rostrales, en donde la transmisión dopaminérgica tiene un carácter sináptico o perisináptico. Esta sugerencia está de acuerdo con las investigaciones realizadas por McGrath y cols. (1999) quienes encontraron un aumento en la ansiedad en ratones que poseían un tono dopaminérgico incrementado en las islas intercaladas.

Cabe mencionar que Lamont y Kokkinides (1998) usando el modelo del “sobresalto acústico potenciado por el miedo” y Guarraci et al. (1999) empleando el “congelamiento condicionado”, encontraron efectos ansiolíticos cuando inyectaron bilateralmente SCH23390 dentro de la superficie dorsal de la amígdala o en regiones cercanas a la isla intercalada principal y las islas intercaladas paracapsulares. Sin embargo, dado que en sus experimentos usaron dosis mayores (3.0 y 2.0 microgramos) del antagonista e inyectaron mayores volúmenes de SCH23390 (1 y 5 microlitros/lado), respectivamente, es posible que el SCH23390 halla difundido desde sus sitios de inyección hacia las islas intercaladas y halla actuando allí, sobre los receptores dopaminérgicos D1 localizados en la región somato dendrítica de sus neuronas atenuando el sobresalto acústico potenciado por el miedo o el congelamiento condicionado. Tales observaciones, estan de acuerdo con nuestros resultados, según los cuales, bajas dosis (30 y 120 ng/lado) y volúmenes reducidos (0.2 microlitros/lado) de SCH23390 inyectados en la vecindad de la isla intercalada principal y de las islas intercaladas paracapsulares inducen efectos ansiolíticos en la prueba “luz-oscuridad”.

El mecanismo neuronal por medio del cual el SCH23390 reduce la ansiedad en el paradigma “luz- oscuridad” no se conoce. Sin embargo, es importante señalar, como ya se hizo en la Introducción de este trabajo que Royer et al. (1999,2000) tienen observaciones que indican que las islas intercaladas, de naturaleza GABAérgica, forman una interfase inhibitoria que controla el tráfico de impulsos entre el núcleo basolateral y el central de la amígdala. De acuerdo con su modelo, el disparo glutamatérgico excitatorio del núcleo basolateral a las islas intercaladas GABAérgicas laterales producen una inhibición de las islas GABAérgicas intercaladas situadas más medialmente, las cuales, controlan en forma inhibitoria al núcleo central de la amígdala. De acuerdo con este modelo, como consecuencia de la eliminación de la inhibición tónica GABAérgica, ejercida sobre el núcleo central de la amígdala, que controla a numerosos núcleos autonómicos implicados en la ansiedad se producirían síntomas de este trastorno

En conclusión, nuestro experimentos sugieren basados en este modelo, que el SCH23390 al bloquear receptores dopaminérgicos D1 facilitatorios, localizados en la porción rostro lateral de la isla intercalada principal y de las islas intercaladas paracapsulares localizadas lateralmente, produciría una disminución de su actividad inhibitoria sobre las islas intercaladas paracapsulares mediales y en consecuencia su activación. Dicha activación, dada la naturaleza GABAérgica de estas islas, daría como resultado final una mayor inhibición del núcleo central de la amígdala y la consecuente disminución de las conductas ansiosas.

En síntesis, nuestros experimentos muestran que el estudio de las acciones de diversos compuestos sobre la química cerebral y sus repercusiones conductuales es una herramienta que hace posible la comprensión de los procesos sinápticos involucrados en determinadas pautas del comportamiento y que, la aplicación de estos conocimientos a la terapéutica, permite elaborar procedimientos cada vez más eficaces e inoocuos para el control de las alteraciones conductuales que ponen en peligro al individuo y a su entorno.

VIII. REFERENCIAS

- Alheid, G.F., Heimer L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, Amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 1998;1,1-39.
- Ardila R. (1975) Psicología Fisiológica. Edit. Trillas, México. Pp. 27-38, 147-170.
- Barnett, A., Ahn, H.S., Billard, W., Gold, E.H., Kohli, J.D., Glock, D., Goldberg LI. (1986) Relative activities of SCH23390 and its analogs in three tests for D₁ / DA₁ dopamine receptor antagonism, *Eur.J.Pharm.* 128:249-253.
- Bartoszyk, G.D., (1998). Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. Involvement of dopamine autoreceptors, *Life Sci.* 62:649-663.
- Brailowsky S. (1995) *Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología*. Fondo de Cultura Económica. México. Pp.
- Boyson SJ, Mc Gonigle P, Molinoff PB. (1986) Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain, *J.Neurosci.* 6:3177-3188.
- Car H, Wisniewska RJ. (2006) Effects of baclofen and L-AP-4 in passive avoidance test in the rats after hypoxia-induced amnesia. *Rep. Pharmacol.* Jan-Feb; 58(1):91-100.
- Crawley JN, Goodwin FK. (1980) Preliminary report of a simple animal behaviour for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 13:167-170.
- Coco, M.L., Kuhn, C.M., El, T.D., Kilts, C.D. (1992). Selective activation of Mesoamygdaloid dopamine neurons by conditioned stress: attenuation by diazepam. *Brain Res.* 590:39-47.
- CONADIC Informa Boletín Especial. Abril-07-2001. *La Epidemiología de la salud Mental en México: Edición especial basado en el día mundial de la salud.*
- Contreras CM, Saavedra M, Rodríguez-Landa JF, Bernal-MB, Gutiérrez-García AG. (2002). Neuroquímica de la emoción y la motivación. En: Hernández-González M (Ed). *Motivación animal y Humana*. México: El Manual Moderno: México. 39-64. (ISSN:970-270-148-1).
- Contreras CM, Rodríguez-Landa JF, Gutiérrez-García AG, Bernal Morales B, Saavedra M. (2003) El estudio experimental de la ansiedad y la depresión. *Ciencia. (Academia Mexicana de Ciencias)* 54(2) 29-39.
- Cooper JR, Floyd E, Bloom, Roth R. (1996) *The biochemical basis of neuropharmacology*. 7^a ed. Edit. New York: Oxford. Pp. 9-48, 88-94, 285-337.

- Costall B, Jones JB, Kelly MB, Naylor RJ, Tomkins DM. (1989) Exploration of mice in black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol.Biochem. Behav.*32:777-785.
- Daneri FM. (2012) Trabajo Práctico."Psicobiología del Estrés". Universidad de Buenos Aires, Facultad de Psicología. 1-25.
- Dahlström, A.,Fuxe,K.,(1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system.I.Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons.*Acta Physiol. Scand.*62(Suppl.232).1-55.
- Davis M. (1998) Are different part of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? *Biol Psychiatry.*44,1239-1247.
- Davis M, Shi C.J. (2001) The amygdala: vigilante and emotion. *Molecular Psychiatry.* 6:13-34.
- Davis, M., Whalen, P.J. (2001)The amygdala: vigilance and emotion. *Mol.Psychiatry.* 6:13-34.
- De Boer,S.F., Koolhaas,J.M.,(2003) Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology.*Eur.J. Pharmacol.*463,145-161.
- Deutch AY, Tam SY, Roth RH. (1985) Footshock and conditioned stress increase 3, 4 dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the ventral tegmental area but not substantia nigra, *Brain Res.*333:143-146.
- DSM IV (1995) Manual Diagnostico de los Trastornos Mentales. Edit. MASSON.Pp.401-456.
- Dumbrille RA, Niznik H, Seeman P. (1985) Separation of dopamine D1 and D2 receptors.*Eur J. Pharmacol. Mar 26;110 (1):151-152.*
- Escobar Briones C, Aguilar Roblero R.A. (2002) Motivación y Conducta: Sus bases biológicas. Edit. El Manual Moderno.México. Capítulo 17 Pp.319-343.
- Fallon JH, Koziell DA, Moore RY.(1978) Catecholamine innervations of the basal forebrain: II.Amygdala suprarhinal cortex and entorhinal cortex.*J.Comp.Neurol.*180:509-532.
- File SE. (1980) The use of social,interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J.Neurosci Meth.* 2:219-236.
- Flores-Gracia,C.,Nuche-Bricaire,A.,Crespo-Ramírez,M., Miledi,R.,Fuxe,K.,Pérez de la Mora, M.,(2010) GABA A P receptor mechanisms in the rat amígdala and its role in the modulation of fear and anxiety. *Psychopharmacology.*212,475-484.
- Fuxe k, Jacobsen KA, Høistad M,Tinner B, Jansson A, Staines WA y Agnati LF. (2003) The Dopamine D1 Receptor-Rich Main and Paracapsular Intercalated Nuclei Cell Groups of the Rat Amigdala: Relationship to the Dopamine Innervation. *Neuroscience;* 000:1-13.

- Fuxe K, Hôkfelt T, Agnati LF, Johansson O, Goldstein M, Perez de la Mora M, Possani L, Tapia R, Teran R, and Palacios R. (1978) Mapping out central catecholamine Neurons: Immunohistochemical Studies on Catecholamine-Synthesizing Enzymes. *Psychopharmacology: A Generation of Progress*, Edited by M.A. Lipton, A. DIMASCIO, AND kf. Raven Press Newyork; 67-94pp.
- Greba Q. Kokkinidis L. (2000) Peripheral and intraamygdalar administration of the dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 blocks fear- potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensibilization of acoustic startle. *Behav. Neurosci.* 114:262-272.
- Goldman H. Howard. (2001) Psiquiatria General. Traducida en inglés. Edit. Manual Moderno. 5ª ed. Pp. 99-107.
- Guarraci FA, Kapp BS. (1999) An electrophysiological characterization of ventral tegmental area dopaminergic neurons during differential pavlovian fear conditioning in the awake rabbit. *Behav. Brain Res.* 99:169-179.
- Guarraci FA, Frohardt RJ, Kapp BS . (1999) Amigdaloid D1 dopamine receptor in involvement in pavlovian fear conditioning. *Brain Research*; 827:28-40.
- Halmilton LC. (2003) *Statistics with Stata*, Duxbury, Belmont, CA.
- Hagan RM, Jones BJ, Jordan CC, Tyers MB. (1990) Effect of 5-HT3 receptor antagonists on responses to selective activation of mesolimbic dopaminergic pathways in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 99:227-232.
- Heinze G. (2003) La ansiedad: Cómo se concibe actualmente. *Ciencia (Academia Mexicana de Ciencias)*. 54(2)8-15.
- Henninger MSH, Ohl F, Holter P, Weibenbacher N, Foschi N, Lorsch AW, Spanagel R, Landgraf R. (2000) Unconditioned anxiety and social behavior in two rat lines selectively bred for high and low anxiety –related behavior. *Behav. Brain Res.* 111:153-163.
- Hernandez –Gomez AM, Aguilar- Roblero R y Pérez de la Mora M. (2002) Role of Cholecystinin- A and Cholecystinin-B receptors in anxiety. *Amino Acids*; 23: 283-290.
- Huang , Kandel ER. (1996) D1/D5 receptors mediate a protein synthesis-dependent late phase of LTP in the amigdala. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22 pp.332.
- Johnston, J.B., (1923) Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. *J. Comp. Neurol.* 35, 337-481.
- Kalat, J.W. (2008). *Biological Psychology*, 10th. Edition. Cengage Learning Eds.

- Kantowitz BH, Roediger III HL, Elmes DG. (2001) Psicología Experimental. Edit. Thomson Learning. México. 7ma ed, Pp.251-256.
- Korte, S.M., Bouws, G.A.H., Koolhaas, J.M., Bonus, B., (1992) Neuroendocrine and behavioral responses during conditioned active and passive behavior in the defensive burying/probe avoidance paradigm: effects of ipsapirone. *Physiol. Behav.* 52, 355-361.
- Kluver H, Bucy PC. (1937) Psychic blindness and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys. *Am J. Physiol.* 119: 352-353.
- Lamont EW, Kokkinidis L. (1998) Infusion of the Dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res.* 795:128-136.
- Lara Ayala ML. (1998) Participación de mecanismos serotoninérgicos cerebrales en la depresión y la ansiedad". Tesis UNAM. Pp. 9-14.
- Le Doux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev. Neurosci.* 2000; 23:155-184.
- Le Doux JE. The emotional brain fear, and the amygdala. *Rev. Cell Mol Neurobiol* 2003;3/4 727-738.
- Marowsky, A., Yanagawa, Y., Obata, K., Vogt, K.E., (2005) A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron* 48, 1025-1037.
- Miserendino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M. (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature.* 345:716-718.
- Mc Donald AJ., (2003) Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 985, 1-21.
- Mc Grath MJ, Campbell KM, Veldman MB, Burton FH. (1999) Anxiety in a transgenic mouse model of cortico-limbic neuropotentiated compulsive behavior. *Behavior Pharmacol.* 10:435-443.
- Millan MJ. (2003) The neurobiology and control of anxious states, *Prog. Neurobiol.* 70:83-244.
- Millhouse OE. (1986) The intercalated cells of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 247:246-271.
- Morris CH.G, Maisto AA. (2001) Psicología. Edit. Pearson Educación. México. 10 ed. Pp. 50-52, 184-209.
- Morris CH.G, Maisto AA. (2005) Psicología. Edit. Pearson Educación. México. Duodécima ed. pp 50-52, 184-209.
- Nader K, LeDoux JE. (1999) Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav. Neurosci.* 113:891-901.

- Oades RD, Halliday GM. (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology, 1: Anatomy and connectivity. *Brain Res. Rev.* 12:117-165.
- Papalia DE, Olds SW. (2004) Psicología. Edit.MCGraw Hill.Mèxico. Pp. 203-363.
- Paré D, Smith Y. (1993) The Intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the Amigdala in cats. *Neuroscience.* 57:1077-1090.
- Paré D.,Quirk,G.J., Le Doux,J.E.,(2004) Newvistas on amygdale networks in conditioned fear.*J. Neurophysiol.*92,1-9.
- Paxinos G, Watson C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*,2 nd ed. London: Academic Press. Pp.26-30.
- 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.
- Pellow S, File SE. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat.*Pharmacol.Biochem Behav.* 24(3): 525-529.
- Pérez de la Mora M. (2003) Donde y como se produce la ansiedad: sus bases biológicas. *Ciencia (Academia Mexicana de Ciencias).* 54(2) 16-28.
- Pérez de la Mora M, Flores-Gracia C, Crespo-Ramírez M, Hernández-Gómez A, Lara García DA. (2007) La amígdala una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad Cap.12, en: *Investigación en Neurociencias en Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco*. Editora Ruth Celis. Edit. Bios Medica. Guadalajara,Zapopan Jalisco.
- Pérez de la Mora M, Lara García,D.,Jacobsen, K.X.,Vázquez-García,M., Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia,C.,Escamilla-Marvan,E.,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. *Eur.J. Neurosci.* 23,2749-2759.
- Peterson SL. (1988) *Drug microinjection in discrete Brain Regions*.Kopf Carrier N₀50,David Kopff Instruments.Tujunga,CA. pp.1-6.
- Ramos A ,Berton O, Mormede P, Chaouloff F. (1997) A Múltiple-Test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behavioural Brain Research.*85:57-69.
- Rodgers RJ, Nikulina EM y Cole JC. (1994) dopamine D1 and D2 receptor ligands Modulate the Behaviour of Mice in the Elevated Plus-Maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 49 (4): 985-995.
- Royer S, Martina M, Paré D. (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J. Neurosci.* 19:10575-10583.
- Royer S, Martina M, Paré D. (2000) Polarized synaptic interactions between intercalated neurons of the amygdala. *J. Neurophysiol.* 83:3509-3518.

- Scibilia RJ, Lachowicz JE, Kilts CD. (1992) Topographic nonoverlapping distribution of D₁ and D₂ dopamine receptor in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain, *Sinapse* 11:146-154.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Wayne AR y Molinoff PB. (1994) *Basic. Neurochemistry*, 5^a ed. Edit., Raven Press, New, York. Pp
- Simon P. Panissaud C, Costentin J. (1992) Sulpiride anxiogenic-like effect inhibition by a D1 dopamine receptor antagonist, *Neuro Report* 3 :941-942.
- Swanson LW, Petrovich GD. (1998) What is the amygdale? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Sun,N., Yi,H., Cassell,M.D.,(1994) Evidence for a GABAergic interface between cortical afferents and brainstem projection neurons in the rat central extended amygdale. *J.Comp.Neurol.*340,43-64.
- Takeshi Inoue,Takeshi Izumi, Yuji Maki, Ihoko Muraki y Tsukasa Koyama. (2000) Effect of the Dopamine D1/5 Antagonist SCH23390 on the Acquisition of Conditioned fear. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 66(3):573-578.
- Tres Guerres JA. (1992) Fisiología Humana. Edit. Interamericano MC Graw-Hill,España-Madrid. 1^a ed. Capítulo 5 y 12.
- Tocris (1999) *Advancing Research for the life Scientist*. Pp.32-33,291.
- Vogel JR, Beer B, Clody DE. (1971) A simple an reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents, *Psychopharmacology.* 21: 1-7.
- Völsch M. (1910) Zur vergleichenden Anatomie des Mandelkerns und seiner Nachbargebilde. II. Teil. *Arch.Mikrosk.Anat.Entwgesch.* 76:373-523.
- Young R, Johnson DN. (1991 a).A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol.Bichem. Behav.*40,739-743.
- Young R, Johnson DN. (1991 b). Comparison of routes of administration and time course effects of zacopride and buspirone in mice using and automated light/ dark test. *Pharmacol. Bichem. Behav.* 40,733-737.

ANEXO 1



Available online at www.sciencedirect.com



Neuroscience Letters 377 (2005) 101–105

Neuroscience
Letters

www.elsevier.com/locate/neulet

Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat

Miguel Pérez de la Mora^{a,*}, Linda Cárdenas-Cachón^a, Mariana Vázquez-García^a,
Mínerva Crespo-Ramírez^a, Kirsten Jacobsen^b, Malin Höistad^c, Luigi Agnati^d, Kjell Fuxe^c

^a Department of Biophysics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-253, 04510 México, D.F., México

^b Department of Cellular and Molecular Medicine, Neuroscience Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canada K1H 8M5

^c Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden

^d Department of Biomedical Science, University of Modena, 41100 Modena, Italy

Received 30 September 2004; received in revised form 10 November 2004; accepted 23 November 2004

Abstract

The intercalated islands are intra-amygdaloid clusters of D1 receptor rich GABAergic neurons, which control impulse traffic between the basolateral complex and the central nucleus of the amygdala. As dopaminergic transmission within the amygdala may play a role in anxiety, the effect of the D1 antagonist SCH23390 microinjected mainly close to the rostral intercalated islands in rats was studied, using the White and Black Box test. SCH23390 reduced anxiety by an increase in the latency of the first entry into the black compartment and by an increase in the total time spent in the white compartment of the White and Black Box test, while there was no significant modification of locomotion. It is suggested that blockade of D1 receptors in the rostral intercalated islands may reduce anxiety through a reduction of GABA-mediated disinhibition of the central amygdaloid nucleus.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Anxiety; Amygdala; Black and White Box; Intercalated islands; Dopamine

Experimental evidence indicates that amygdala plays a key role in the integration and expression of fear and anxiety in several species of animals, including rats and humans [5,15]. Relevant sensory information from the environment is relayed to the lateral and basolateral amygdala from the cerebral cortex and thalamus. After processing, it is sent to the centromedial nuclear groups of the amygdala, through which an appropriate fear output is implemented. Projections from the medial and central amygdaloid nuclei to specific hypothalamic and midbrain targets give rise to different autonomic signs of fear and anxiety [5,15].

Convincing evidence by Paré and coworkers [22,23] has indicated that impulse traffic from the basolateral complex to the central nucleus of the amygdala is controlled by intercalated cell islands [16], clusters of inhibitory GABAergic

cells [13,17] interposed between the basolateral complex and centromedial amygdaloid nuclei. The intercalated islands receive excitatory glutamatergic input from the basolateral nucleus and send inhibitory GABAergic fibers to the central nucleus [18,22,23]. It has been shown that these cell islands are rich in D1 dopamine receptor binding sites in comparison with other amygdaloid nuclei [24] and receive an important dopaminergic input [1,6]. This dopaminergic innervation of the intercalated islands has been shown to be preferentially directed to the rostromedial main intercalated island and to the paracapsular intercalated islands, while there is only a sparse dopaminergic innervation of the rostromedial and caudal portions of the main intercalated island [6].

It has been reported that intra-amygdaloid injections of the specific D1 antagonist SCH23390 reduces the Fear-Potentiated Acoustic Startle response [12] and the Conditioned Freezing response in rats [7]. It is thus possible that dopaminergic mechanisms are involved in the modulation of

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56225659; fax: +52 55 56225607.
E-mail address: mperez@ifc.unam.mx (M.P. de la Mora).

fear output of the amygdala, through the activation of D1 receptors located on the intercalated cell islands. The aim of the present work is to further explore this possibility by injecting SCH23390 bilaterally in the vicinity of the rostral main intercalated and paracapsular islands which are innervated by DA terminals [1,6], and to measure the behavior of rats in an unconditioned test of anxiety, the White and Black Box test [4,9].

Male Wistar rats ($n=38$) from 250 to 270 g (from Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico) were housed individually in a controlled environment (temperature 22 °C, lights on 06:00–18:00 h) with water and food ad libitum. The experiments were conducted according to the guidelines established by the local Mexican Ethics Committee, and efforts were taken to minimize the suffering of the animals throughout all experimental procedures.

For implantation of permanent cannulas into the amygdala, the rats were anesthetized with ketamine hydrochloride (170 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic frame (Kopf Instruments, Tujunga, USA) with the incisor bar set at -3.3 mm. The body temperature was maintained at 37 °C using a CMA/150 Temperature Controller (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden). Bilateral stainless steel guide cannulas 0.46 mm o.d., (C315G, Plastics One, Roanoke, USA) were positioned near the rostralateral main intercalated island, (coordinates AP: -2.12 mm, L: ± 4.7 mm, V: -7.0 mm) from bregma according to the atlas of Paxinos and Watson [19]. Guide cannulas were affixed with stainless steel screws and dental acrylic cement (Laboratorios Arias, Mexico City, Mexico) and sealed with a dummy cannula (C315DC, Plastics One, Roanoke, USA). Estreptobenzetacil V-Fortificado (20,000 i.u., i.m.) was given to prevent infection (Fort Dodge Animal Health Labs, Mexico City, Mexico).

After 7 days of recovery, the rats were handled once a day for 5 min for 3 days. Rats were used for only one behavioral trial. In order to keep the animals in a similar alimentary condition and in this way to uniform at least to some degree their basal levels of anxiety the rats were kept since the night before the experiment in the experimental room without food but with water ad libitum. On the day of the experiment, either the D1 antagonist SCH23390 in saline or saline vehicle was injected bilaterally via an injection cannula, 0.20 mm o.d. (C315I, Plastics One, Roanoke, USA) which protruded 1 mm beyond the end of the guide cannula. Low doses (30 or 120 ng) of SCH23390 (Tocris, Ellisville, USA) in 0.2 μ l saline or saline alone was microinjected bilaterally (0.2 μ l/side) during a period of 5 min, using a CMA/100 Microinjection Pump (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden). The cannulas were kept in place for 30 s after the injection to prevent backflow of the substance, and behavioral tests started immediately after the injection.

Behavioral experiments were carried out in a sound-attenuated room equipped with video-recording facilities. The boxes used for the evaluation of behavior were

placed beneath the video camera, and the behavior was recorded in the absence of any observer. Anxiety-related behavior was measured using a White and Black Box test [4,9]. The box was made of acrylic and divided into two compartments, connected by a small opening (7 cm \times 7 cm). The walls and floor of one compartment (27 cm \times 27 cm \times 27 cm) were in white, while those of a smaller compartment (27 cm \times 18 cm \times 27 cm) were in black. Squares of 9 cm \times 9 cm were marked on the floor of both compartments using either black or white lines. During the experiments, the white compartment was strongly illuminated with a cold white light source (700 lx), whereas the black compartment was illuminated with a red light lamp (70 lx). At the beginning of the experiment, the rat was placed in the center of the white compartment facing the opening between the two compartments, and the behavior was video-recorded for 5 min. The latency of the first entry into the black compartment and the total time spent in the white compartment were taken as measures of anxiety [4,9]. The number of lines crossed in each compartment was recorded as an index of locomotion [4,9].

In addition, immediately after testing the animals in the White and Black Box test, locomotion was also measured in an Open Field (40 cm \times 40 cm \times 30 cm) divided in 16 squares (10 cm \times 10 cm) as previously described [10]. The rat was placed in one of the corners of the box and allowed to explore the arena for 5 min. The number of square crossings was counted from the video-recordings, and these were determined as the number of instances that at least (3/4) part of the rat body reached the adjacent square. All experiments were conducted between 11:00 and 16:00 h. The rats were assigned to each group in a randomized way, which allowed to have rats injected with the different treatments at different times of the experiment.

At the end of the experiment, the animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (65 mg/rat; Laboratorios Ttokyo, Mexico City, Mexico) and 0.2 μ l of a diluted solution of Pontamine sky blue (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) was microinjected bilaterally via their injection cannulas. The rats were perfused intracardially with saline followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6. The brains were removed and postfixed in the same fixative for 1–2 weeks. The placement of the cannulas was verified on coronal sections (45 μ m) made with a cryostat (CM 1510-3, Leica Instruments, Nussloch, Germany) and counterstained with cresyl violet. Only rats with at least one cannula tip in the area of interest were included in this study ($n=38$). In the White and Black Box test, the latency (the time to first enter the black compartment), and the total time spent in the white compartment are given in seconds and shown as medians with interquartile range. For the locomotion results the number of lines crossed in each compartment of the White and Black Box and the number of squares crossed in the Open Field test is presented as mean \pm S.E.M. to facilitate the reading of Table 1. Since with a limited number of observations it is difficult to know whether the population under study

Table 1
Effects of the intra-amygdaloid microinjection of SCH23390 on locomotion

Test	Saline (n = 12)	SCH23390 30 ng (n = 16)	SCH23390 120 ng (n = 10)	Kruskal–Wallis test
White and Black Box				
In white + black compartments	101 ± 5.3	96.6 ± 4.2	97.8 ± 5.7	$H_{2,35} = 0.276, P > 0.05$
In white compartment only	14 ± 2.7	17.1 ± 2.3	18.9 ± 2.5	$H_{2,35} = 1.38, P > 0.05$
In black compartment only	86.3 ± 4.0	79.5 ± 3.5	78.9 ± 5.1	$H_{2,35} = 1.84, P > 0.05$
Open Field	115 ± 10	89.5 ± 9.2	89.2 ± 11.6	$H_{2,35} = 2.75, P > 0.05$

Locomotion values in both compartments of the Black and White Box test are reported as means ± S.E.M. of the number of lines crossed in each compartment. Locomotion in the Open Field test is expressed as mean ± S.E.M. of the number of squares crossed. For methodological details and statistical analysis, see text and legend to Fig. 2.

follows a normal distribution non-parametric methods were used for the statistical analysis of the results. Accordingly, both anxiety (Fig. 2) and locomotion (Table 1) results were analyzed with the Kruskal–Wallis test [8]. Significant differences were analyzed by the Dunn's test as a post hoc test comparing the SCH23390-treated groups against their respective saline-treated controls. Significance was set at $P < 0.05$. Statistical parameters were computed using GraphPad Prism 4 statistical software.

Thirty-eight animals had bilateral cannula placements which had at least one of their cannulas tips localized near the area of interest (at Br –1.8 and –2.56 mm) i.e. near or within the rostralateral portion of the main intercalated island, and/or in the vicinity of the paracapsular islands (Fig. 1). The location of all cannula placements used in this study is depicted schematically in Fig. 1 Only rats with cannula placements located bilaterally from Br –1.8 to –2.56 mm were included in the study.

Bilateral intra-amygdaloid injections of SCH23390 (30 and/or 120 ng) increased significantly both the latency of the rats for the first entry into the dark compartment ($H_{2,35} = 10.08$), and the total time spent in the white compartment (only high dose) ($H_{2,35} = 6.08$) of the White and Black Box test (Fig. 2).

No significant effects were observed in the total number of lines crossed in the black + white compartments of the White and Black Box test, while a slight decrease, and a trend for an increase in line-crossing, which did not reach significance, was registered in the dark and the white compartments, respectively, at the doses of SCH23390 used in this study (30 and 120 ng) (see Table 1). Likewise, no effects of SCH23390 were found on the locomotor activity, as measured by the number of squares crossed in the Open Field test (Table 1).

It has been reported that in the rat the bilateral intra-amygdaloid injection of 3 and 2 µg SCH23390/side causes a reduction of the Fear-Potentiated Startle [12] and the Conditioned Freezing Startle [7], respectively. However, in order to avoid a loss in specificity and to keep its effects restricted to a region near to the site of injection we employed lower doses of this antagonist. Although it is difficult to establish comparisons it is worth mentioning that the ID_{50} for the inhibition of DA-induced renal vasodilatation is 3.5 nmol (1.13 µg) when SCH23390 was injected into the renal artery of anaesthetized dogs [2]. Thus, the effects of bilateral intra-amygdaloid

injections (30 or 120 ng) of the specific D1 receptor antagonist SCH23390 on the behavior of rats were studied using the White and Black Box test, a well validated unconditioned paradigm of anxiety, in which rodents are in conflict to either explore or to avoid a brightly lit environment for which they feel a natural aversion [4,9]. It was found that SCH23390 in both doses significantly increased the latency for the first entry into the dark compartment, and in the high dose the total time spent in the white compartment of the box (Fig. 2) indicating that intra-amygdaloid administration of SCH23390 causes a dose-dependent reduction of the spontaneous aversion for a bright environment. Since the use of this paradigm has given identical results in rats selectively bred for high anxiety-related behaviors [9] and after the systemic administration of anxiolytic doses of diazepam and other anxiolytic compounds [4] our results may suggest that SCH23390 exerts an anxiolytic effect in this model. This is supported by results from experiments carried out in conditioned models of anxiety, such as the Fear-Potentiated Acoustic Startle test [12] and the Conditioned Freezing test [7], in which SCH23390 injected into the amygdala caused a reduction in the scores of different indexes of anxiety. However, Rodgers et al. [21] and Bartoszyk [3] found no clear or no effects on anxiety after systemic administration of SCH23390 using either the Elevated Plus Maze test or the Ultrasonic Vocalization paradigm. On the other hand, Simon et al. [25] showed that SCH23390 administered systemically 30 min before the White and Black Box test reduces the spontaneous aversion of mice for a bright environment, by shortening the latency to enter the *white* compartment when they are initially placed in the *dark* compartment of the White and Black Box test.

The possibility that the anxiolytic effects of SCH23390 were the result of interference with the motor activity of the rats seems unlikely, since although there is a slight decrease in locomotion in the Open Field test, the effects were statistically non-significant and the locomotion in both the white + black compartments (total locomotion) and in the dark compartment of the White and Black Box test was not affected (Table 1). In fact, there was an increase of locomotion, which did not reach significance within the white compartment (Table 1) as has been reported for other anxiolytic drugs [4]. Moreover, it has been shown using the White and Black Box test, that in spite of a reduction in locomotor activity, induced by a systemic administration of SCH23390, the

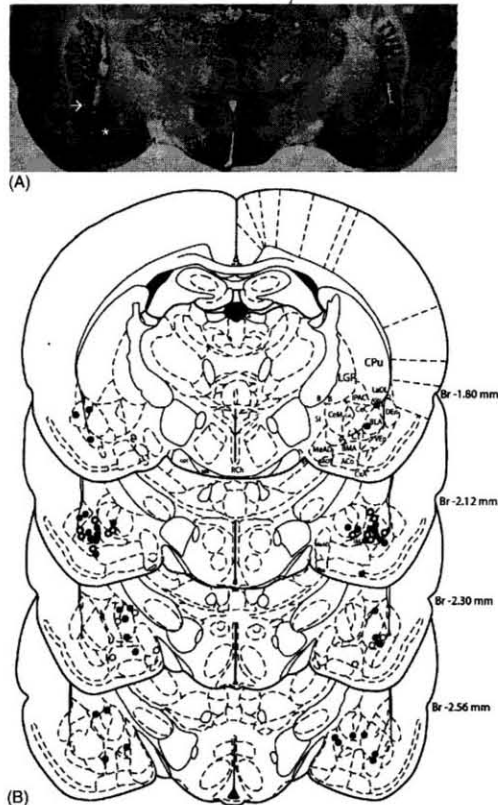


Fig. 1. (A) Representative section through the amygdala (Br -2.12) showing a bilateral cannula placement. The star and the arrow indicate the rostralateral portion of the main intercalated island and the paracapsular space, respectively, where the paracapsular islands are located. (B) Schematic representation of the sites of cannula implantation within the amygdala as verified by histological examination (see text). Sections of amygdala were taken from the rat brain atlas of Paxinos and Watson [19] at Br -1.8, -2.12, -2.30 and -2.56 mm, respectively (top-to-bottom). White circles: control; gray circles: 30 ng SCH23390; and black circles: 120 ng SCH23390. Abbreviations: Aco: anterior cortical amygdaloid nucleus; B: basal nucleus Meynert; BAOT: bed nucleus accessory olfactory tract; BLA: basolateral amygdaloid nucleus, ant; BMA: basomedial amygdaloid nucleus; CeC: central nucleus, lateral division, capsular; CeM: central nucleus medial division, Cpu: caudate putamen; CxA: cortex-amygdala transition zone; DEN: dorsal endopiriform nucleus; I: Intercalated nuclei amygdala; IM: intercalated amygdaloid nucleus, main; LaDL: lateral amygdaloid nucleus, dorsolateral; LGP: globus pallidus; MeAD: medial amygdaloid nucleus, dorsal; opt: optic tractus; Rch: retrochiasmatic area; SI: substantia innominata; sox: supraoptic decussation; and VEn: ventral endopiriform nucleus.

latency to the first entry into the white compartment when the rat is initially placed in the *dark* compartment is shortened, indicating that the rats are not impaired in their movements within the box [25].

The main intercalated island and the paracapsular intercalated islands are rich in D1 receptor binding sites in compari-

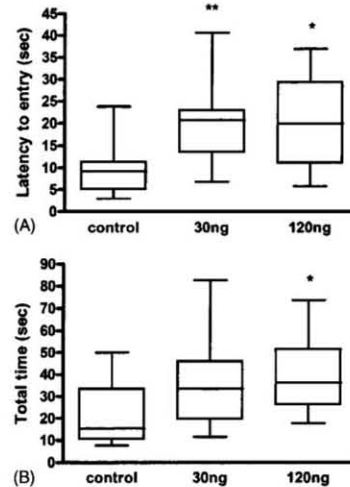


Fig. 2. Effects of the intra-amygdaloid injection of SCH23390 on the anxiety of rats in the Black and White Box test. Results are expressed (in seconds) as medians with the respective interquartile range (boxes). The whiskers indicate the highest and lowest values within the sample. SCH23390 increased: the latency to first enter into the dark compartment (both doses) (A) and the total time spent in the white compartment (high dose only) (B). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ against the control, Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test, comparing SCH23390-treated groups against the respective saline-treated groups. Control: $n = 12$, SCH23390; 30 ng, $n = 16$; SCH23390 120 ng, $n = 10$.

son with other amygdaloid nuclei [24]. Moreover, recent experiments by Fuxe et al. [6] have shown that the rostralateral portion of the main intercalated island and the paracapsular intercalated islands are densely innervated by dopamine terminals. In our experiments most of the cannula placements were on, or in the vicinity of the rostralateral portion of the main intercalated island and/or of the paracapsular intercalated islands (Fig. 1). Since under the injection conditions used ($0.2 \mu\text{l}$ over 5 min) the spread of a drug is rather limited [11,20] it is plausible that SCH23390 had exerted its anxiolytic effects in anatomical structures located near to the site of injection. It may thus be suggested that SCH23390 decreases anxiety by blocking D1-mediated dopaminergic transmission in the rostral main intercalated island and the paracapsular intercalated islands, where the DA transmission is mainly synaptic and/or perisynaptic in character [6]. This is in line with findings by McGrath et al. [14] who found increased anxiety in mice having increased D1-mediated actions within the intercalated islands.

In experiments by Lamont and Kokkinidis [12] and Guaraci et al. [7], bilateral injections of SCH23390 into the dorsal surface of the amygdala or into regions located dorsally and/or caudally to the main intercalated and paracapsular islands, induced anxiolytic effects in two different conditioned tests of anxiety [7,12]. Since in their experiments, larger doses (3.0 and $2.0 \mu\text{g}$, respectively) and volumes of SCH23390 (1.0 and $0.5 \mu\text{l}/\text{side}$, respectively) were used, it is possible that

SCH23390 had diffused from the sites of injection into the main and paracapsular intercalated islands, thereby attenuating the Fear-Potentiated Acoustic Startle or the Conditioned Freezing by blocking the D1 receptors in these islands. These findings are in line with the results presented here, in which a low dose and low volume (30 or 120 ng, 0.2 μ l/side) of SCH23390 injected in the vicinity of the rostralateral main and paracapsular islands induced an anxiolytic effect in the White and Black Box test.

The neuronal mechanism by which SCH23390 reduces anxiety in the White and Black Box test remains to be established. Royer et al. [22,23] have shown that the GABAergic intercalated islands constitute an inhibitory interface controlling the impulse traffic between the basolateral and central nuclei of the amygdala. They proposed that glutamatergic input from the basolateral nucleus to the lateral GABAergic intercalated islands results in an inhibition of the medial intercalated GABA islands, which in turn allows a development of activity in the central amygdaloid nucleus due to a removal of tonic GABA inhibition with the subsequent elicitation of anxiety.

In conclusion, we suggest on the basis of this model that in our experiments SCH23390 blocked the facilitatory D1 receptors in the rostralateral main intercalated island which led to reduced GABAergic inhibition of adjacent medially located GABAergic intercalated islands projecting to the central amygdaloid nucleus (see [6]). In this way, GABA inhibition of the central nucleus will become increased and hence anxiety will become reduced by the intra-amygdaloid microinjection of the D1 antagonist.

Acknowledgment

This paper was supported by the grant IN216001 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and the Swedish Research Council.

References

- [1] E. Asan, Ultrastructural features of tyrosine hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala, *Cell Tissue Res.* 288 (1997) 449–469.
- [2] A. Barnett, H.-S. Ahn, W. Billard, E.H. Gold, J.D. Kohli, D. Glock, L.I. Goldberg, Relative activities of SCH 23390 and its analogs in three tests for D₁/DA₁ dopamine receptor antagonism, *Eur. J. Pharm.* 128 (1986) 249–253.
- [3] G.D. Bartoszyk, Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. Involvement of dopamine autoreceptors, *Life Sci.* 62 (1998) 649–663.
- [4] B. Costall, B.J. Jones, M.E. Kelly, R.J. Naylor, D.M. Tomkins, Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32 (1989) 777–785.
- [5] M. Davis, P.J. Whalen, The amygdala: vigilance and emotion, *Mol. Psychiatry* 6 (2001) 13–34.
- [6] K. Fuxe, K.A. Jacobsen, M. Höistad, B. Tinner, A. Jansson, W.A. Staines, L.F. Agnati, The dopamine D1 receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: relationship to the dopamine innervation, *Neuroscience* 119 (2003) 746–773.
- [7] F.A. Guaracci, R.J. Frohardt, B.S. Kapp, Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning, *Brain Res.* 827 (1999) 28–40.
- [8] L.C. Hamilton, *Statistics with Stata*, Duxbury, Belmont, CA, 2003.
- [9] M.S.H. Henninger, F. Ohl, Holter, P. Weijßenbacher, N. Toschi, N. Lorsch, A. Wigger, R. Spanagel, R. Landgraf, Unconditioned anxiety and social behavior in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behavior, *Behav. Brain Res.* 111 (2000) 153–163.
- [10] A.M. Hernandez-Gomez, R. Aguilar-Roblero, M. Pérez de la Mora, Role of cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptors in anxiety, *Amino Acids* 23 (2002) 283–290.
- [11] T.A. James, M.S. Starr, Effects of the rate and volume of injection of the pharmacological response elicited by intranigral microapplication of drugs in the rat, *J. Pharmacol. Methods* 1 (1978) 197–202.
- [12] E.W. Lamont, L. Kokkinidis, Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH 23390 into the amygdala blocks fear expression in a potentiated startle paradigm, *Brain Res.* 795 (1998) 128–136.
- [13] A.J. McDonald, J.R. Augustine, Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala, *Neuroscience* 52 (1993) 281–294.
- [14] J. McGrath, K.M. Campbell, M.B. Veldman, F.H. Burton, Anxiety in a transgenic mouse model of cortico-limbic neuropotentiated compulsive behaviour, *Behav. Pharmacol.* 10 (1999) 435–443.
- [15] M.J. Millan, The neurobiology and control of anxious states, *Prog. Neurobiol.* 70 (2003) 83–244.
- [16] O.E. Millhouse, The intercalated cells of the amygdala, *J. Comp. Neurol.* 247 (1986) 246–271.
- [17] D. Paré, Y. Smith, Distribution of GABA immunoreactivity in the amygdaloid complex of the cat, *Neuroscience* 57 (1993) 1061–1076.
- [18] D. Paré, Y. Smith, The intercalated cell masses project to the central and medial nuclei of the amygdala in cats, *Neuroscience* 57 (1993) 1077–1090.
- [19] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed., Academic Press, London, 1986.
- [20] S.L. Peterson, *Drug Microinjection in Discrete Brain Regions*. Kopf Carrier No 50, David Kopf Instruments, Tujunga, CA, 1988, pp. 1–6.
- [21] R.J. Rodgers, E.M. Nikulina, J.C. Cole, Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze, *Pharm. Biochem. Behav.* 49 (1994) 985–995.
- [22] S. Royer, M. Martina, D. Paré, An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala, *J. Neurosci.* 19 (1999) 10575–10583.
- [23] S. Royer, M. Martina, D. Paré, Polarized synaptic interactions between intercalated neurons of the amygdala, *J. Neurophysiol.* 83 (2000) 3509–3518.
- [24] R.J. Scibilia, J.E. Lachowicz, C.D. Kilts, Topographic non-overlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain, *Synapse* 11 (1992) 146–154.
- [25] P. Simon, C. Panissaud, J. Costentin, Sulpride anxiogenic-like effect inhibition by a D1 dopamine receptor antagonist, *NeuroReport* 3 (1992) 941–942.

ANEXO II

GLOSARIO.

ACTH: La hormona adenocorticotropa o corticotropina es una hormona polipeptídica producida por la hipófisis y que estimula a las glándulas suprarrenales, quienes a su vez secretan a los glucocorticoides

ANSIOLÍTICO: Sustancia empleada para combatir la ansiedad, tales como alcohol, opiáceos, barbitúricos y benzodiacepinas. (Rosenzweig, 1995 ,pp.826).

ANSIOGÉNICO: Sustancia que aumenta los parámetros del miedo y la ansiedad.

AGONISTA: Es una sustancia que tiene una alta afinidad por un receptor y que produce una actividad intrínseca similar a la del ligando endógeno.

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.

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.

COMT: Catecol-O-metil transferasa. Enzima degradadora de la dopamina.

CONDICIONAMIENTO CLÁSICO: Forma de aprendizaje asociativo en el cual un estímulo originalmente neutro (un estímulo condicionado) a través de un apareamiento con un estímulo nocivo que produce una respuesta particular (estímulo incondicionado), adquiere el poder de producir dicha respuesta. Dicho condicionamiento es también llamado condicionamiento Pavloviano.

CONDICIONAMIENTO INSTRUMENTAL: Forma de aprendizaje asociativo en el cual la probabilidad de que un acto sea realizado dependerá de las consecuencias (estímulos reforzadores) que lo siguen.

DEFECAR U ORINAR.- Evacuación de heces y micción.

FIBRAS AFERENTES SENSORIALES: Axones que conducen impulsos nerviosos desde los órganos de los sentidos hasta el sistema nervioso central; es lo contrario de eferente.

FIBRAS EFERENTES: Axones que transmiten información desde el sistema nervioso a la periferia.

GABA: Ácido gamma-amino-butírico. Inhibidor del sistema nervioso por excelencia.

GANGLIOS BASALES: Grupo de núcleos del cerebro anterior que se encuentran en la base de los hemisferios cerebrales.

HABITUACIÓN: Forma de aprendizaje no asociativa caracterizado por la reducción en la amplitud de la respuesta que sigue a las presentaciones repetidas de un estímulo.

HVA: Ácido homovanílico. Metabolito de la dopamina, resultado de la acción de la enzima mono-amino-oxidasa (MAO).

HAZ NIGRO-ESTRIATAL: Tracto dopaminérgico que va de la sustancia negra mesencefálica al globo pálido y al núcleo caudo-putamen.

HUSMEAR.- Oler, inspeccionar y explorar la caja o habitación, tanto en cuatro como dos patas.

INHIBICIÓN LATERAL: Fenómeno producido por neuronas interconectadas que inhiben a sus vecinas produciendo contraste en los bordes del estímulo.

IMPULSOS NERVIOSOS: Mensajes eléctricos propagados en una neurona que se transmiten a través del axón a las neuronas adyacentes, también llamados potenciales de acción.

L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA): En la vía de síntesis de dopamina, la L-DOPA es el sustrato que da lugar a la dopamina por acción de la enzima aminoácido descarboxilasa.

MAO: Enzima mono-amino-oxidasa. Degrada a la dopamina en metabolitos.

PORCION CAUDAL: Término anatómico que significa hacia la parte posterior (en animales en dirección a la cola)

PORCION LATERAL: Término anatómico que significa hacia el lado, opuesto a medial.

PORCION MEDIAL: Término anatómico que significa hacia el medio, opuesto a lateral.

PORCION ROSTRAL: Término anatómico que significa hacia el extremo cefálico opuesto a caudal.

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.

QUIETA O ESTAR INMÓVIL (conducta de congelamiento o “freezing”) .- Quedarse en un solo lugar sin realizar otra conducta aparente.

“REARING”.- Sostenerse con sus dos patas traseras, levantando las manos para sujetarse al barandal de la caja y poder husmear.

SISTEMA LIMBICO: Grupo de estructuras cerebrales interconectadas que integran experiencia y respuestas emocionales.

SCH23390: Antagonista de receptores dopaminérgicos tipo D1

ANEXO III

Indicé de Tablas.	Página.
Tabla 1.-Prevalencia de la ansiedad a lo largo de la vida del ser humano.	14
Tabla 2.-Breve historia del sistema límbico y las emociones.	19
Tabla 3.- Resultados,efectos de la microinyección amigdalina de SCH23390 sobre la ansiedad.	56
Tabla4.-Resultados, efectos de la microinyección micro-amigdalina de SCH23390 sobre la locomoción en prueba de “Caja luz oscuridad “y “Campo abierto”.	62
Indicé de Figuras.	
Figura 1.- Muestra un corte coronal de tejido amigdalario indicando la localización del núcleo basolateral,núcleo central, isla paracapsular. Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).	24
Figura 2.- Muestra las conexiones intra-amigdalinas. Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).	26
Figura3.-Muestra el sistema binario de comunicación de los impulsos nerviosos.Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).	29
Figura 4.-Muestra el flujo de información dentro de la amígdala. Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).	30
Figura 5.-Muestra un esquema general de la comunicación química entre una neurona y una célula efectora.Tomado de Pérez de la Mora et al. (2007).	31
Figura 6.- Muestra un esquema general de la vía de síntesis de las catecolaminas. Tomado de Contreras et al. (2002).	32
Figura 7.Muestra las tres vías principales dopaminérgicas y sus proyecciones hacia algunas estructuras cerebrales involucradas en la emoción y motivación.Tomado de Contreras et al. (2002).	33
Figura 8.- Muestra el esquema general de las tres principales vías noradrenérgicas.Tomado de Contreras et al. (2002).	36
Figura 9A.- Muestra sección representativa de la amígdala cerebral donde se observa el tracto dejado de la colocación bilateral de cánulas.	51
Figura 9B.-Muestra la localización de los sitios de inyección dentro de la amígdala.	52

Figura 10.- Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la latencia para entrar al compartimento oscuro de la “caja luz-oscuridad”.	53
Figura 11.- Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado de la “caja luz-oscuridad”.	54
Figura 12.- Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre el número de transiciones entre los compartimientos de la “caja luz-oscuridad”.	55
Figura 13.- Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre el número de elongaciones desde el compartimento oscuro hacia el iluminado de la “caja luz-oscuridad”.	55
Figura 14.- Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la locomoción en el compartimento iluminado de la “caja luz-oscuridad”.	57
Figura 15.- . Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la locomoción en el compartimento oscuro de la “caja luz-oscuridad”.	57
Figura 16.- Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la locomoción en el compartimento iluminado+compartimento oscuro de la “caja luz-oscuridad”.	58
Figura 17.-Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la locomoción horizontal en el “Campo abierto”	59
Figura 18.-Efecto de la inyección intramigdalina del SCH23390 sobre la locomoción vertical en el “Campo abierto”.	60
Diagrama de Trabajo.	49
Indicé de Fotografías.	
Fotografía 1.-Muestra el equipo utilizado para el registro y calificación de la conducta de las pruebas “caja luz oscuridad”.	40
Fotografía 2.- Muestra ambos compartimientos y la manera en que se encuentra dividida en cuadrantes y el tipo de iluminación que se utilizó en la prueba de la “caja luz oscuridad”	41
Fotografía 3.- Muestra la prueba de “campo abierto” utilizada midiendo la conducta locomotora de las ratas.	42,46
Fotografía 4.-Muestra como el sujeto es montado en el aparato estereotáxico para la implantación de las cánulas guía en la amígdala a nivel del bregman 2.12mm.	44

Fotografía 5. Muestra la “caja luz-oscuridad” hecha de acrílico dividida en 2 compartimientos que se encuentran conectados entre sí por una abertura de 7x7cm. 45

Hojas de calificación.

Hoja de calificación conductual del modelo luz-oscuridad 81

Hoja de calificación conductual del modelo campo abierto. 82

Esquema anatómico para la localización de cánulas implantadas

Tomado del Atlas de Paxinos y Watson (1986).

Nivel Br -2.12 mm 83

Nivel Br -2.30 mm 84

Nivel Br -2.56 mm 85

ANEXO IV

HOJA DE CALIFICACION CAJA LUZ OSCURIDAD.

Latencia entrar compartimiento oscuro	
Latencia para reentrar compartimiento iluminado	
Tiempo de permanencia compartimiento iluminado	
Numero de transiciones entre compartimientos	
Numero de elongaciones desde compartimiento oscuro	
Tiempo total de permanencia en el compartimiento oscuro	

HOJA DE CALIFICACION PRUEBA CAMPO ABIERTO.

ACTIVIDAD VERTICAL	
ACTIVIDAD HORIZONTAL	
NUMERO DE RAEARING´S	
NUMERO DE BOLOS	

HOJA DE CALIFICACION PARA LOCALIZACION DE IMPLANTES.

26

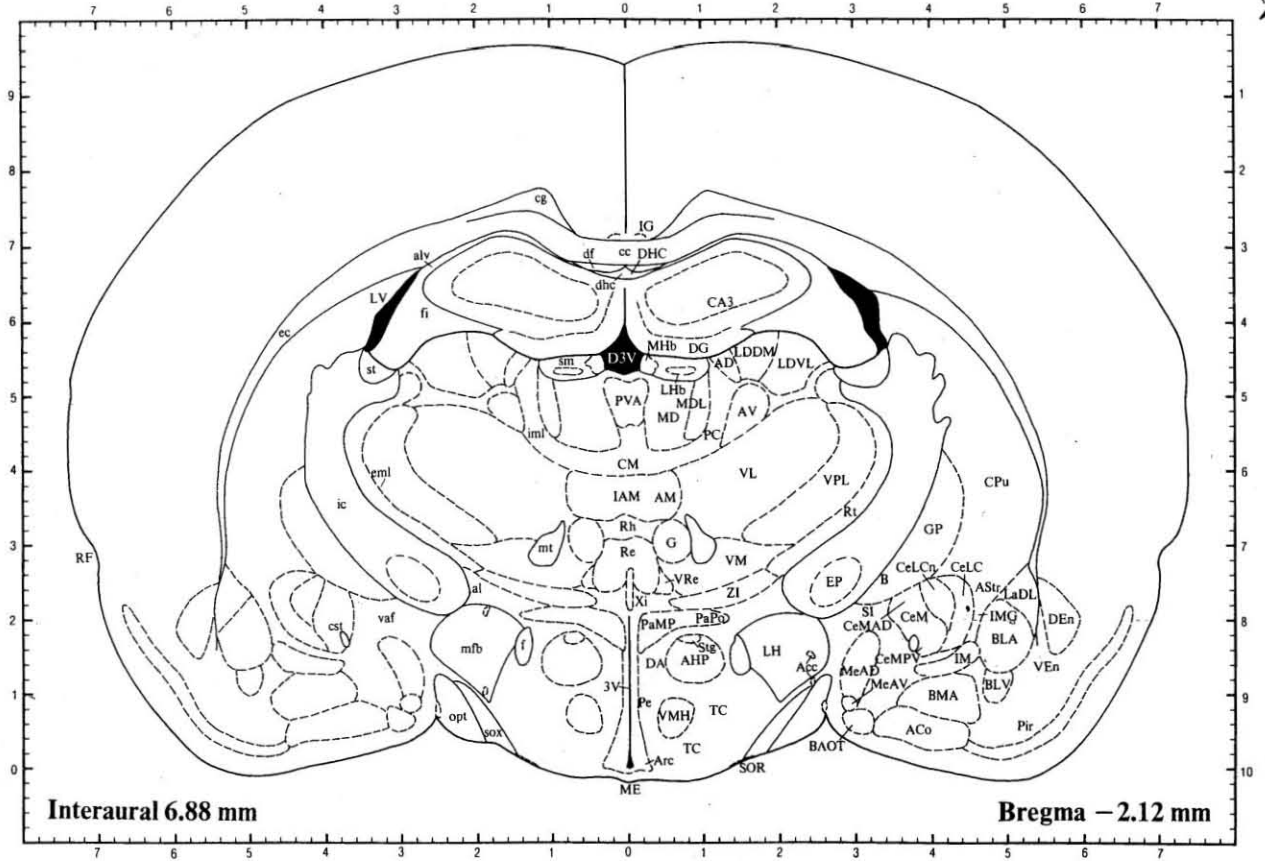
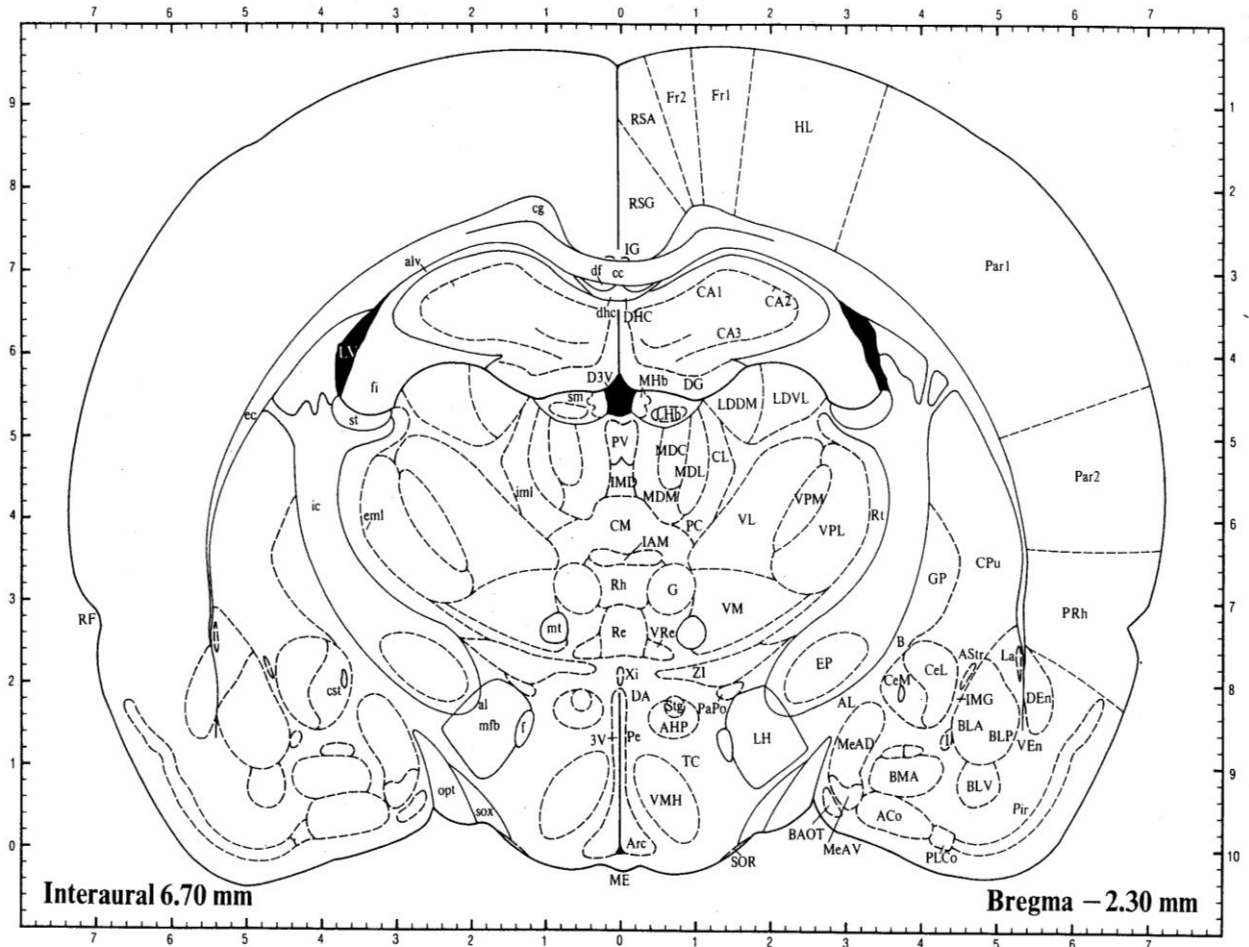


Figure 26

3V 3rd ventricle	BMA basomedial amygdaloid nu, ant	df dorsal fornix	IMG amygdaloid intramedullary gray	mt mammillothalamic tract	sox supraoptic decussation
Acc accessory neurosecretory nuclei	CA3 field CA3 of Ammon's horn	DG dentate gyrus	ImI internal medullary lamina	opt optic tract	st stria terminalis
ACo anterodorsal thal nu	cc corpus callosum	dhc dorsal hippocampal commissure	LaDL lateral amygdaloid nu, dorsolat	PaMP paraventricular hypoth nu, med	Sig stigmoid hypoth nu
AD anterodorsal thal nu	CeLC cent amyg nu, lat div, capsular	DHC nu dorsal hippocampal com	LDDM laterodorsal thal nu, dorsomed	PaPo paraventricular hypoth nu, post	TC tuber cinereum
AHP anterior hypoth area, posterior	CeLCo cent amyg nu, lat div, central	ec external capsule	LDVL laterodorsal thal nu, ventrolat	PC paracentral thal nu	vaf ventral amygdalofugal pathway
al ansa lenticularis	CeM central amyg nu, med div	eml external medullary lamina	LH lateral hypoth area	Pe periventricular hypoth nu	VEa ventral endopiriform nu
alv alveus hippocampus	CeMAD cent amyg nu, med, anterior	EP entopeduncular nu			

HOJA DE CALIFICACION PARA LOCALIZACION DE IMPLANTES.



27

Figure 27

3V 3rd ventricle	CeM central amy nu, med div	f fornix	LDVL laterodorsal thal nu, ventrolat	Par2 parietal cortex, area 2	st stria terminalis
ACo anterior cortical amygdaloid nu	cg cingulum	fi fimbria hippocampus	LH lateral hypoth area	PC paracentral thal nu	Stg stigmoid hypoph nu
AHP anterior hypoth area, posterior	CL centrolateral thal nu	Fr1 frontal cortex, area 1	LHB lateral habenular nu	Pe periventricular hypoph nu	TC tuber cinereum
al ansa lenticularis	CM central medial thal nu	Fr2 frontal cortex, area 2	LV lateral ventricle	Pir piriform cortex	VEN ventral endopiriform nu
AL nu ansa lenticularis	CPu caudate putamen	G gelatinous thal nu	MDC mediadorsal thal nu, central	PLCo posterolateral cortical amy nu	VL ventrolateral thal nu
alv alveus hippocampus	cst commissural stria terminalis	GP globus pallidus	MDL mediadorsal thal nu, lateral	PV paraventricular thal nu	VM ventromedial thal nu
Arc arcuate hypoph nu	D3V dorsal third ventricle	HL hindlimb area of cortex	MDM mediadorsal thal nu, medial	Pe eminence thal nu	
B basal nu Meynert	DA dorsal hypoth area	I intercalated nuclei amygdala	MF median eminence		

