



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE ANSIEDAD
EN RATONES "KNOCKOUT" 5-HT1B Y "WILD
TYPE" A DIFERENTES EDADES: ESTUDIO
FARMACOLÓGICO-CONDUCTUAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARÍA GUADALUPE MORALES TRUJILLO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CAROLINA LÓPEZ RUBALCAVA

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m346359



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Diferencias en los niveles de ansiedad en ratones "Knockout" 5-HT1B y "wild Type" a diferentes edades: estudio Farmacológico-Conductual."

realizado por **María Guadalupe Morales Trujillo**

con número de cuenta 40007412-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Directora de Tesis

Propietario Dra. Carolina López Rubalcava

Propietario Dra. Gabriela Rodríguez Manzo

Propietario Dra. Erika Montserrat Estrada Camarena

Suplente Dra. Lucía Alba Martínez Mota

Suplente Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo

Consejo Departamental de Biología **FACULTAD DE CIENCIAS**

M. en C. **Juan Manuel Rodríguez Chávez**



Dedico este trabajo al esfuerzo de toda mi familia, ella me ha formado como persona y ha dirigido mi educación, incluyendo la institucional; el trabajo que comenzó hace diecisiete años se concretiza en esta tesis y la obtención de un título que no es para mí, sino para sumar los ocho.

Mi dedicación y agradecimiento especiales a una mujer de valor que ha dejado huella en cada uno de sus hermanos, quiénes agradecemos todos y cada uno de los sacrificios que ha tenido en su vida por nosotros. La formación universitaria que ella no tuvo otros la conseguimos a través suyo y su final para mí es ahora. Por ti, Ángeles.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Carolina López Rubalcava por su inmensurable ayuda en mi formación dentro de la investigación y por su apoyo incondicional como directora y como persona.

Gracias al jurado por sus valiosas críticas, su tiempo y su experiencia, las cuáles permitieron mejorar este trabajo.

Agradezco enormemente a Isa, quién no solamente me enseñó cosas del laboratorio, sino muchísimo más; a Julián, por su tiempo y sus consejos, por su apoyo y sus buenas pláticas; a Eri, por darme su ayuda y su tiempo siempre que la necesitaba.

Capítulo 1	Importancia de los estudios con animales “knockout” (KO)	1
1.1	Ratones “knockout” de serotonina	2
1.2	Generación de ratones “knockout” del receptor 5-HT1B (KO-1B)	3
1.3	Características de los ratones “knockout” del receptor 5-HT1B (KO-1B)	4
Capítulo 2	Serotonina	7
2.1	Características generales de la serotonina	7
2.2	Receptores serotoninérgicos	10
2.2.1	Receptor 5-HT1A	13
2.2.2	Receptor 5-HT1B	14
Capítulo 3	Serotonina y edad	16
Capítulo 4	Serotonina y ansiedad	18
4.1	Definición de ansiedad	18
4.2	Clasificación de la ansiedad	19
4.3	Sistema serotoninérgico y desórdenes de ansiedad	20
Capítulo 5	Modelos animales para el estudio de la ansiedad	23
5.1	Modelo de enterramiento defensivo	23
5.2	Modelo de transiciones luz/oscuridad	25
Capítulo 6		27
6.1	Planteamiento del problema	27
6.2	Hipótesis	27
6.3	Objetivos	27
Capítulo 7	Materiales y métodos	29
7.1	Sujetos experimentales	29
7.2	Pruebas conductuales	29
7.3	Tratamiento farmacológico	30
Capítulo 8	Resultados	32
8.1	Comparación de los niveles basales de ansiedad en ratones WT y KO-1B en los modelos de enterramiento defensivo y de transiciones luz/oscuridad	32
8.2	Comparación de los niveles de ansiedad con la administración de la 8-OH-DPAT en ratones WT y KO-1B en los modelos de enterramiento defensivo y de transiciones luz/oscuridad	38
Capítulo 9	Discusión y conclusiones	50

9.1	Diferencias basales en ansiedad y conducta ambulatoria entre ratones WT y KO-1B	50
9.2	Análisis del efecto de la 8-OH-DPAT en modelos de ansiedad y conducta ambulatoria entre ratones WT a diferentes edades	53
9.3	Análisis del efecto de la 8-OH-DPAT en modelos de ansiedad y conducta ambulatoria entre ratones KO-1B a diferentes edades	57
9.4	Conclusiones	59
Anexo 1	Generación de ratones "knockout"	61
Anexo 2	Otros sistemas de neurotransmisión implicados en la regulación de la ansiedad	65
Referencias		70

CAPÍTULO 1

IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS CON ANIMALES “KNOCKOUT” (KO)

En el campo de la investigación biomédica se hace uso de múltiples herramientas biotecnológicas. Una de las técnicas clave desarrolladas es la delección de genes particulares, proceso conocido como creación de un “*knockout*”; modelo animal que se basa en la eliminación de la expresión de un gen en particular (Griffiths y cols., 2000). Por medio de este método se pretende caracterizar la participación de un gen específico en patologías humanas concretas (Griffiths y cols., 2000).

Algunos biólogos moleculares han considerado que la función de un gen blanco puede ser determinada por la comparación entre los fenotipos de ratones no modificados, *wild type* (WT) y los *knockout* (KO). En muchos casos, el cambio fenotípico más sobresaliente en los ratones knockout es la alteración de su conducta (Nelson y Young, 1998). Esta técnica genética ofrece un método novedoso para entender las bases genéticas de la conducta (Nelson, 1997). Hay que considerar que el uso de ratones “knockout” no implica aceptar que las conductas complejas están controladas por un solo gen, sino que los ratones knockout proveen información sobre los mecanismos subyacentes a una conducta determinada (Galli-Taliadoros y cols., 1995). Además, los resultados obtenidos mediante el empleo de los ratones knockout pueden ser confirmados con otros métodos de estudio, como los farmacológicos (Nelson y Young, 1998).

Los genes involucrados en los desórdenes psiquiátricos son difíciles de identificar, sin embargo, muchos desórdenes psiquiátricos están asociados con fenotipos intermedios que pueden ser modelados y estudiados en ratones “knockout”, incluyendo cambios cerebrales fisiológicos y anatómicos y pruebas conductuales. Se han creado ratones como modelo para el estudio de desórdenes neurológicos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Huntington y esquizofrenia. La importancia de estos modelos reside en la contribución al entendimiento de los mecanismos patogénicos que subyacen a estos desórdenes (Beglopoulos y Shen, 2004).

1.1 RATONES “KNOCKOUT” DE SEROTONINA

Los modelos animales ayudan a evaluar el efecto de una mutación genética y a identificar nuevos genes con posibles implicaciones en el desarrollo de enfermedades humanas, incluyendo las psiquiátricas.

A partir de la identificación de un gen o una vía de neurotransmisión particular, los ratones knockout han sido usados para estudiar la interrelación de diferentes genes en un sistema específico (Seong y cols., 2002). En un intento por descubrir las particularidades funcionales del sistema serotoninérgico se ha echado mano de las técnicas moleculares para inactivar por mutaciones diferentes receptores serotoninérgicos y proteínas que controlan el metabolismo de la serotonina así como el transportador serotoninérgico y las aminoxidasas A y B (MAO A y B) y creando ratones “knockout” (Lucas y Hen, 1995).

El estudio de los ratones poseedores de diferentes mutaciones en el sistema serotoninérgico ha ofrecido nueva información sobre el papel de los diferentes componentes del sistema serotoninérgico y su importancia en el desarrollo de algunos trastornos psiquiátricos (Gingrich y Hen, 2001).

Un trastorno psiquiátrico que ha sido relacionado con receptores serotoninérgicos particulares, es la ansiedad. Se ha reportado que los ratones “knockout” para el receptor 5-HT_{1A} (KO-1A) muestran niveles elevados de ansiedad respecto a los WT en los modelos de laberinto elevado, prueba de luz/oscuridad y aversión, en una prueba de campo abierto (Heisler y cols., 1998; Parks y cols., 1998; Ramboz y cols., 1998; Zhuang y cols., 1999). Mientras que otras cepas de ratones “knockout”, como los 5-HT_{2C} parecen ser menos “ansiosos”, como lo indican estudios con la prueba de laberinto elevado (Zhuang y cols., 1999); la cepa KO-1B muestra niveles bajos de ansiedad en comparación con su control WT en los modelos de vocalizaciones ultrasónicas (Brunner y cols., 1999), campo abierto (Zhuang y cols., 1999) y enterramiento defensivo (López-Rabalcava y cols., 2000). Por otra parte, los ratones KO-5A tienen incrementada la conducta exploratoria en campo abierto, pero no tienen diferencias con los ratones WT en

los niveles de ansiedad medidos en el modelo de laberinto elevado de brazos abiertos (Grailhe y cols., 1999).

Otra conducta bien caracterizada, es la agresión. El incremento en la conducta agresiva e impulsiva siempre ha sido asociado con niveles bajos de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (Higley y Linnoila, 1997). Los ratones KO-1B se reportan como más impulsivos y agresivos, además de tener una vulnerabilidad alterada a las drogas de abuso (Ramboz y cols., 1996, Brunner y Hen, 1997; Searce-Levie y cols., 1999a).

Aunque se supone una relación inversa entre los niveles de serotonina y la agresión, Cases y cols. (1995) demostraron que los ratones carentes de la enzima MAO_A tienen un fenotipo de agresión incrementado. Estos ratones exhiben niveles altos de serotonina y agresión a lo largo de su vida (Cases y cols., 1995).

1.2. GENERACIÓN DE RATONES “KNOCKOUT” DEL RECEPTOR 5-HT_{1B} (1B-KO)

Como se mencionó anteriormente, existe un esfuerzo por hallar nuevas aproximaciones para establecer la participación que un sistema particular tiene sobre una o más patologías. Un esfuerzo claro, es el realizado en torno al sistema serotoninérgico, dando particular importancia a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}.

En el caso de los ratones “knockout” para el receptor 5-HT_{1B}, el gen del receptor 5-HT_{1B} fue roto por recombinación homóloga (Capecchi, 1989). Se formaron dos construcciones genéticas. La construcción “A” formada por 6.0 kilopares de bases (kb) de secuencia genética, en la cual la parte que codifica la secuencia 5-HT_{1B} fue reemplazada por un gen de neomicina (*neo*) fosfotransferasa bajo el control de la GTI-II (Lufkin y cols., 1991). En la construcción “B”, el casete *neo* fue inserto en la secuencia que codifica para el gen 5-HT_{1B}. Los dos vectores blanco alineados fueron analizados por electroforesis dentro de células madre embrionarias y las colonias resistentes a G418 fueron reconocidas por la técnica

de "southern blotting". A través de pruebas bioquímicas se encontraron clones positivos; células de estos clones fueron microinyectadas dentro de blastocistos de ratones C57BL/6 de 3.5 días de edad. Las quimeras positivas fueron cruzadas con hembras de la cepa 129/Sv para obtener heterocigotos. Los ratones heterocigotos fueron fenotípicamente normales y fértiles. Los animales homocigotos derivados de ambas líneas celulares fueron generados por cruzamiento heterocigótico. La progenie, como se esperaba, resultó en una proporción 1:2:1 "wild type" (WT), heterocigotos y mutantes homocigotos. Los mutantes homocigotos no desplegaron ninguna anomalía obvia en su desarrollo ni en su conducta, tampoco en su fertilidad (Ramboz y cols., 1996) [Fig.2].

1.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS RATONES "KNOCKOUT" DEL RECEPTOR 5-HT_{1B} (KO-1B)

Luego de la creación de los ratones KO-1B, se inició la caracterización fisiológica y conductual de estos animales, a la vez que se ha descubierto que una variedad de conductas son moduladas a través del receptor 5-HT_{1B}.

Malleret y cols. (1999) sometieron a los ratones KO-1B a una serie de pruebas conductuales dirigidas al análisis de diferentes componentes cognitivos y emocionales. Al realizar una prueba de exploración encontraron que los ratones WT y los KO-1B no muestran diferencias en su actividad locomotora. Sin embargo, los ratones KO-1B, despliegan baja tigmotaxis (un índice de ansiedad en algunas pruebas conductuales) asociado con un alto nivel de actividad exploratoria de objetos, pero no se observaron diferencias entre cepas en la prueba de ansiedad del laberinto elevado de brazos abiertos.

Otras investigaciones en torno a la ansiedad, encuentran que en el modelo de campo abierto (Zhuang y cols., 1999) y en el modelo de vocalizaciones ultrasónicas (Brunner y cols., 1999), los ratones KO-1B son menos "ansiosos" que

los WT, mientras que en el modelo de laberinto elevado de brazos abiertos, los niveles de ansiedad fueron similares o menores en los ratones KO-1B comparados con de los WT (Brunner y cols., 1999). En contraste, Ramboz y cols. (1996) no encontraron diferencias en los niveles de ansiedad entre los ratones KO-1B y los WT utilizando el modelo de luz/oscuridad.

Con relación a otras conductas, Molleret y cols. (1999) sometieron a los ratones a la prueba de Morris en el agua (modelo de aprendizaje) y encontraron que los ratones KO-1B tienen mayor actividad en las pruebas de transferencia y adquisición de la memoria, sin mostrar diferencias en su capacidad visual. En esta misma prueba evaluaron los niveles de "miedo" que el animal muestra y encontraron una respuesta normalmente en los ratones KO-1B como en los WT frente a los estímulos estresantes. Otros reportes (Bouwknicht y cols., 2001) sugieren que los ratones KO-1B despliegan conductas fisiológicas y conductuales exageradas frente a estímulos desconocidos que provocan estrés y desencadenan "miedo". Ramboz y cols. (1996), reportan que los ratones KO-1B tienen una mayor respuesta al aislamiento y al estrés o miedo generado por un intruso y sugieren que los receptores 5-HT_{1B} pueden ser activados en situaciones estresantes. También hay reportes de estudios que evaluaron la agresión y hallaron que los ratones KO-1B muestran un incremento en esta conducta (Brunner y Hen, 1997).

Por otro lado, se reportan diferencias en la reactividad de los ratones WT y los KO-1B, siendo mayor esta conducta en los ratones KO-1B (Dalawa y cols., 1997).

La conducta sexual de los ratones KO-1B está alterada en comparación con su cepa correspondiente WT. Interesantemente, los ratones KO-1B parecen tener el componente de motivación sexual facilitado dado que inician una serie copulatoria más rápidamente que los WT, sin embargo el componente de ejecución de la conducta parece estar alterado, pues requieren más estimulación para alcanzar la eyaculación (Rodríguez-Manzo y cols., 2002).

La cepa de ratones KO-1B se ha propuesto como un modelo animal para el estudio de la conducta impulsiva (Brunner y Hen, 1997; Searce-Levie y cols. muestran un incremento de conductas impulsivas, tales como la agresión, la exploración en espacios novedosos y conducta sexual (Brunner y Hen, 1997; Brunner y cols., 1999; Searce-Levie y cols., 1999a). Bouwknecht y cols. (2001) también indican que los ratones KO-1B son más impulsivos que los WT, pero que su conducta es estímulo-específica.

Por otra parte, estos animales muestran menor estimulación locomotora en respuesta a la droga de abuso llamada éxtasis (3,4-metoxilenedioxi-N-metanfetamina, MDMA) y la auto-administración de cocaína más rápida que los ratones WT (Riegel y French, 1999; Searce-Levie y cols., 1999b). Finalmente, se reporta que los ratones KO-1B beben más alcohol y son menos sensibles a la ataxia provocada por éste, que los ratones WT (Crabbe y cols., 1996). Tomando en cuenta estos antecedentes, puede considerarse que los ratones KO-1B pueden servir como un modelo de vulnerabilidad alterada a las drogas de abuso (Searce-Levie y cols., 1999a).

CAPÍTULO 2

SEROTONINA

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SEROTONINA

La serotonina o 5-hidroxitriptamina es un neurotransmisor de la clase de las indolaminas y su nombre se abrevia como 5-HT (Rosenzweig y cols., 2003). Inicialmente, la serotonina fue aislada en el suero sanguíneo y se le atribuyeron efectos vasoconstrictores (Rapport, 1948), posteriormente fue detectada en el cerebro (Twarog y Page, 1953).

La serotonina se encuentra en muchas células del cuerpo, como las plaquetas de la sangre, las células enterocromatines del tracto gastrointestinal y por supuesto, en neuronas. Existe mucha más serotonina periférica de la que hay en el cerebro, cuya suma representa del 1 al 2% de su cantidad total; la serotonina también se encuentra en la glándula pineal, donde su función es ser precursora de la melatonina (Conn, 2003).

La serotonina tiene un papel filogenéticamente antiguo en la neurotransmisión neuronal (Turlejski, 1996). Dado que el sistema serotoninérgico está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, éste influye en casi toda las esferas de la fisiología de los mamíferos, desde la regulación cardiovascular (Miyata y cols., 2000; Nebigil y cols, 2000; Thorin et al., 1990), la respiración, el sistema gastrointestinal (Kato y cols., 1999), la sensibilidad al dolor, la termorregulación, el mantenimiento de los ritmos circadianos, el apetito, la agresión, la actividad sensorial-motora y la conducta sexual hasta el estado de ánimo, la cognición, el aprendizaje y la memoria (Golden y Gilmore, 1990; Sheard, 1969; Gorzalka y cols., 1990; Fernstrom y Wurtman, 1971).

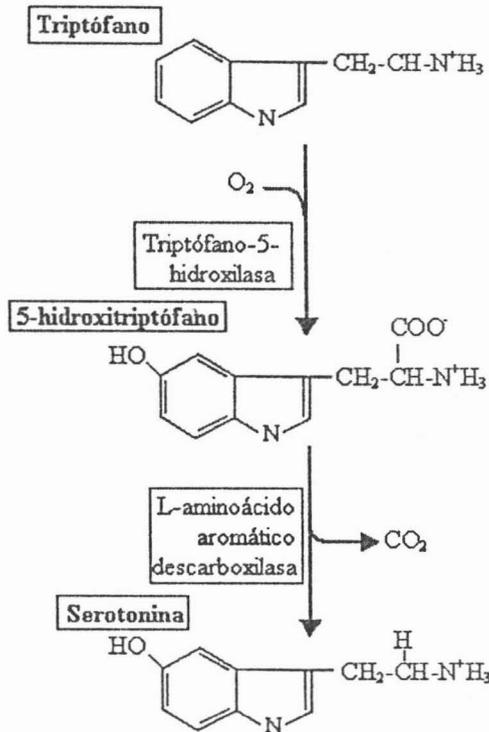


FIGURA. 1. SÍNTESIS DE SEROTONINA

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido esencial triptófano, el cual cruza la barrera hematoencefálica. En las neuronas serotoninérgicas, el triptófano es hidroxilado por una enzima conocida como triptófano hidroxilasa produciendo 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Esta enzima usa el oxígeno molecular y el cofactor tetrahidropteridina; y su actividad es regulada por fosforilación, calcio, fosfolípidos y proteólisis parcial. El segundo paso enzimático en la formación de la serotonina es la descarboxilación del 5-HTP. Esto es completado por una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Esta enzima también descarboxila L-DOPA para producir dopamina (Rosenzweg y cols., 2003) [Fig. 1]. En la degradación de la 5-HT participa la enzima monoaminoxidasa que la lleva a la formación de la 5-hidroxilamina acetoaldehído, que después podrá convertirse en ácido 5-hidroxi-

indolacético (5-HIAA) por efecto de una deshidrogenasa o en 5-hidroxitriptofol por acción de una reductasa [Fig. 2].

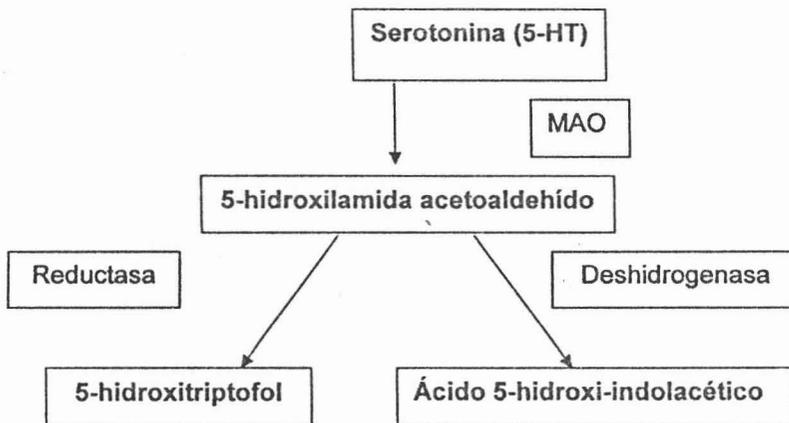


FIGURA 2. DEGRADACIÓN DE LA SEROTONINA

Las neuronas serotoninérgicas son parte de uno de los sistemas neuronales más ampliamente distribuidos en el cerebro de los mamíferos; esta red neuronal es también una de las más tempranamente desarrolladas en el embrión. Las neuronas que contienen serotonina se originan en cuatro núcleos del tallo cerebral (los principales son los núcleos del rafé dorsal y medial) y se proyectan al cerebro medio. El núcleo del rafé dorsal proyecta delgadas fibras de serotonina, las cuales son más abundantes en la corteza, mientras que el núcleo del rafé medial, proyecta densas fibras de serotonina con grandes varicosidades que están relativamente esparcidas y son más abundantes en el hipocampo (Kosofsky y Molliver, 1987), el cual recibe fibras siguiendo un curso dorsomedial a través de la corteza cingulada (Rubenstein, 1998) [Fig. 3].

Durante el desarrollo de la corteza, las regiones corticales tienen diferentes perfiles de maduración de axones serotoninérgicos terminales (D'Amato y cols., 1987; DeFelipe y cols., 1991).

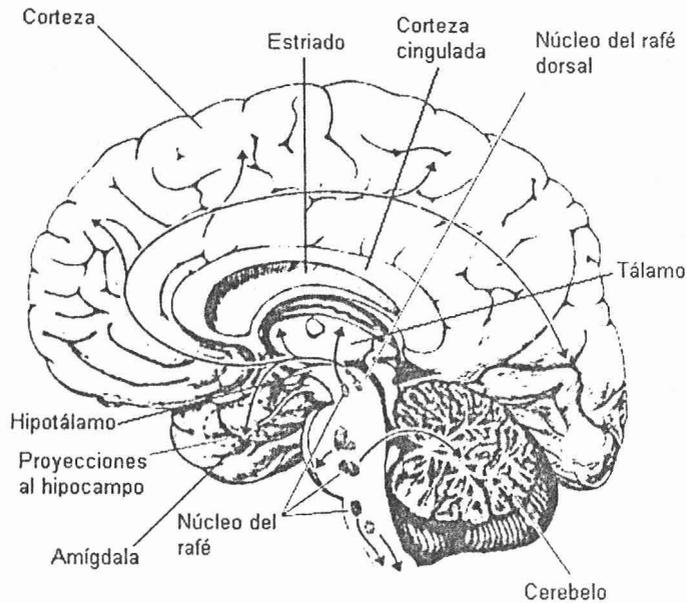


FIGURA 3.- ESQUEMA DE LAS PRINCIPALES VÍAS SEROTONÉRGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

2.2 RECEPTORES SEROTONÉRGICOS

Desde su descubrimiento, la serotonina ha sido implicada en una amplia variedad de papeles fisiológicos tanto en el sistema nervioso central, como en el periférico. Esta variedad de efectos está mediada a través de su interacción con receptores específicos localizados en las neuronas (presinápticas y postsinápticas), además de otros tipos de células con el músculo liso y el endotelio vascular (Jacobs y Azmitia, 1992).

En 1957, Gaddum y Picarelli reportaron la existencia de dos subtipos de receptores serotoninérgicos a los cuales llamaron 5-HT-M y 5-HT-D, ya que se antagonizaban con morfina y dibenzilina, respectivamente. Peroukota y Snyder (1979) reclasificaron a los receptores serotoninérgicos, basándose en estudios de unión a radioligandos en homogenados de cerebro. La aplicación de técnicas de

clonación molecular en la década de los 80 revolucionó el descubrimiento de proteínas y su resultado fue la clonación de 14 distintos subtipos de receptores serotoninérgicos en mamíferos. Conjuntamente, la estructura molecular y las propiedades farmacológicas, determinaron su clasificación y de acuerdo con un sistema revisado, los receptores serotoninérgicos están integrados en siete subfamilias, 5-HT_{1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7} (Hoyer y cols., 1994) [Fig.4].

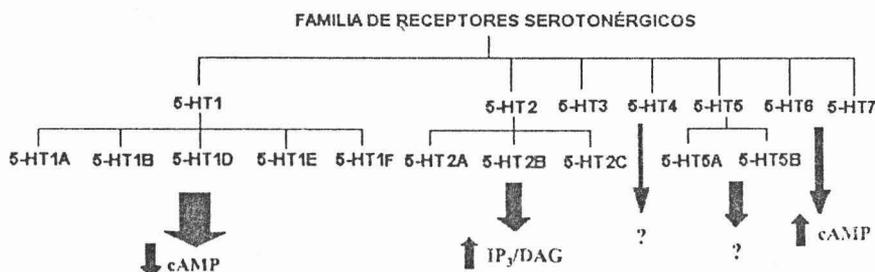


FIGURA 4.- FAMILIA DE LOS RECEPTORES 5-HT.

Los receptores 5-HT en mamíferos son comúnmente divididos en 7 subfamilias codificadas por 14 genes únicos (Lovenberg y cols., 1993). Los receptores 5-HT tienen dos formas básicas, ligandos ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Sólo uno de los subtipos de receptores, el receptor 5-HT₃ es ionotrópico, el resto está acoplado a proteínas G (Boes y Martín, 1994) [Fig. 6].

La subfamilia 5-HT₁ es la más grande, con 5 subtipos, los cuales inhiben la actividad de la adenilato ciclasa cuando son estimulados. La siguiente subfamilia en tamaño es la 5-HT₂ con tres miembros, todos acoplados al sistema de transducción de la fosfolipasa C. La subfamilia 5-HT₅ tiene dos integrantes con mecanismos de acoplamiento desconocidos. Finalmente, las subfamilias 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ cada una con un miembro son receptores acoplados positivamente a la adenilato ciclasa, la subfamilia 5-HT₃ está formada por un solo miembro (Baez y cols., 1995) [Figs. 4 y 5].

RELACIONES ENTRE RECEPTORES 5-HT

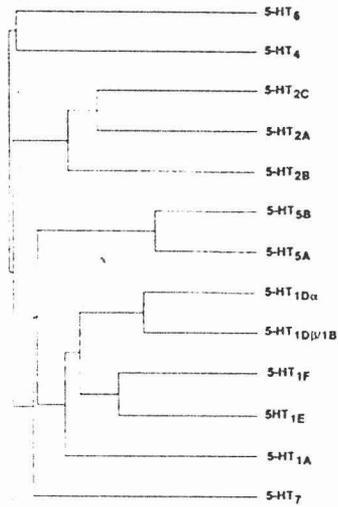


FIGURA 5.- RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS RECEPTORES 5-HT. TOMADA DE BAEZ Y COLS., 1995.

Modelos de los receptores serotoninérgicos

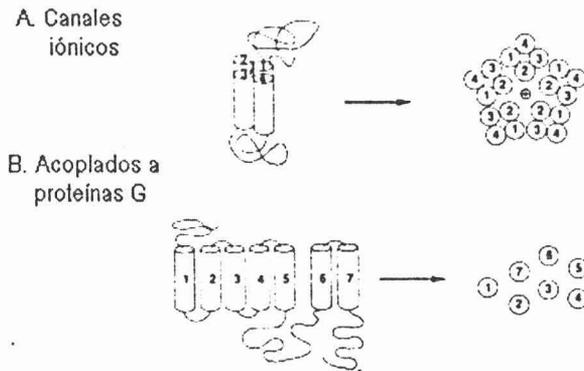


FIGURA 6.- MODELOS ESTRUCTURALES DE LOS RECEPTORES 5-HT. TOMADA DE BAEZ Y COLS., 1995.

2.2.1 RECEPTOR 5-HT_{1A}

Se ha tenido un interés particular en algunos receptores 5-HT por su distribución en áreas cerebrales que controlan una gama de funciones nerviosas; el receptor 1A (5-HT_{1A}) es uno de ellos.

El receptor 5-HT_{1A} tiene una amplia distribución en el cerebro de los mamíferos. Se halla postsinápticamente en el hipocampo, el septum, la amígdala, la sustancia gris periacueductal, la corteza entorrinal y la corteza frontal. Presinápticamente se encuentra en los núcleos del rafe, donde está abundantemente expresado y actúa como un auto-receptor (Celada y cols., 2001; Chalmers y Watson, 1991; Pompeiano y cols., 1992), cuya activación lleva a la supresión de la actividad neuronal serotoninérgica (Albert y cols., 1990).

Debido a su distribución anatómica, los receptores 5-HT_{1A} participan modulando la liberación de la serotonina como auto-receptores en los núcleos del rafe, mientras que pueden modular la actividad neuronal del sistema límbico postsinápticamente (Schreiber y De Vry, 1993).

La activación de los receptores 5-HT_{1A} facilita el incremento de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, modulando la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y de los corticosteroides. La actividad de está aumentada en respuesta al estrés actuando a través de múltiples loci tanto en el hipotálamo, como en otras estructuras límbicas (Chaouloff, 1995; Fletcher y cols., 1996; Jorgensen y cols., 1998, 2001; Carrasco y Van de Kar, 2003). El aumento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal puede desensibilizar a los receptores 5-HT_{1A} (mayoritariamente a los presinápticos comparados con los postsinápticos). Este proceso contribuye a la potenciación de la transmisión serotoninérgica bajo condiciones estresantes. Se sabe además que las hormonas esteroideas están regulando la acción de algunos ansiolíticos que actúan a través de receptores 5-HT_{1A} (McKittrick y cols., 1995; Barton y cols., 1999; Laaris y cols., 1999; López-Rubalcava y cols., 1999). De acuerdo con estos datos, algunos estudios preclínicos sugieren que el receptor 5-HT_{1A} participa en procesos que

subyacen a la emoción. El receptor 5-HT_{1A} ha recibido particular atención como un posible blanco para el tratamiento de desórdenes afectivos como la ansiedad y la depresión (Belzung, 2001; Griebel, 1995; Hamon, 1997; Holmes y cols., 2001).

Farmacológicamente hay evidencias que sugieren que los agonistas del receptor 5-HT_{1A} tienen acciones ansiolíticas, al igual que algunos antagonistas parciales de este receptor administrados sub-crónicamente. En este sentido, los estudios preclínicos reportan que agonistas 5-HT_{1A} como la buspirona, la ipsapirona, el indorrenato y la 8-hidroxi-di-n-metiltriptamina (8-OH-DPAT) tienen actividad ansiolítica usando el modelo de enterramiento defensivo (López-Rubalcava, 1996). Estos efectos son reproducibles usando diferentes modelos animales (File y Seth, 2003; Prut y Belzug, 2003; Sánchez, 2003; Barrett, 1992; Hscoët y cols., 1994; Stanhope y Dourish, 1996; King y cols., 1997; Heisler y cols., 1998; Parks, 1998; Ramboz, 1998).

Aunque pareciera que los agonistas 5-HT_{1A} tienen efectos ansiolíticos, también se reporta que la activación de estos receptores puede tener efectos contrarios (ansiógenicos) o carecer de ellos (Dourish, 1987; Handley, 1991; Eison y Eison, 1994).

Investigaciones independientes han demostrado a través del uso de ratones "knockout" del receptor 5-HT_{1A} que la eliminación completa de estos receptores lleva al incremento en los niveles de ansiedad (Schreiber y DeVry, 1993; Charrier y cols., 1994; DeVry, 1995; Molewijk y cols., 2000; Blanchard y cols., 2003; Bourin y Hascoët, 2003).

2.2.2 RECEPTOR 5-HT_{1B}

Los receptores 5-HT_{1B} parecen estar claramente involucrados en una serie de conductas instintivas en los animales. Algunas líneas de evidencia sugieren que cambios en la sensibilidad de auto y/o hetero-receptores pueden ser

fundamentales para desórdenes psiquiátricos como depresión, ansiedad, desorden obsesivo-compulsivo y otras patologías (Moret y Briley, 2000).

Agonistas de los receptores 5-HT₁ con cierta selectividad hacia los receptores 5-HT_{1B} como el RU24969, la eltoprazina, la fluprazina o el TFMPP se han reportado como inductores de respuestas ansiogénicas en ratas (Griebel y cols., 1990; Pellow y cols., 1987) y en ratones (Benjamín y cols., 1990; Rodgers y cols., 1992).

A través del uso de antagonistas más selectivos Chopin y cols. (1998), mostraron la posible implicación de los receptores 5-HT_{1B} en la ansiedad. Antagonistas del receptor 5-HT_{1B/D} y 5-HT_{1B}, GR 127935 y SB 224289, incrementan el tiempo total que los ratones permanecen en la cámara iluminada en el paradigma de luz/oscuridad, sugiriendo que las drogas ejercen un efecto ansiolítico en este modelo de ansiedad (Chopin y cols., 1998).

A partir de estudios son modelos de ansiedad se sugiere que agonistas del receptor 5-HT_{1B} inducen o exacerbaban un estado de ansiedad mientras que sus antagonistas producen ansiólisis. Teóricamente, la estimulación del auto-receptor 5-HT_{1B} por un agonista disminuye la liberación de serotonina y puede actuar como un ansiolítico. Los antagonistas, por el contrario, aumentan la liberación de serotonina lo que explica su efecto ansiogénico (Moret y Briley, 2000).

CAPÍTULO 3

SEROTONINA Y EDAD

Antes de tomar su papel como neurotransmisor en el cerebro maduro, la serotonina juega un papel importante en la regulación del desarrollo temprano del cerebro. En los mamíferos, todos los sistemas de neurotransmisión aminérgicos están presentes relativamente pronto durante el desarrollo, pero en particular, el sistema serotoninérgico (Sodhi y Sanders-Bush, 2004; Whitaker-Azmitia, 2001; Chubakov y cols., 1985; Kojima, 1982).

El desarrollo de las neuronas serotoninérgicas ha sido ampliamente estudiado en un importante número de especies animales, incluyendo la rata (Mazer y cols., 1997; Lidov y Molliver, 1982), el pollo (Ahmad y Zamenhof, 1978; Kojima, 1988), los primates no humanos (Lambe y cols., 2000) y los humanos (Gross y cols., 2002). En todas estas especies el estado funcional máximo del sistema serotoninérgico se presenta durante etapas tempranas del desarrollo y sus niveles en adultos son en realidad más bajos que en los animales jóvenes (Whitaker-Azmitia, 2001).

La variación en los niveles cerebrales de serotonina se ha relacionado con desórdenes nerviosos como la depresión, la ansiedad, el autismo y el síndrome de Down (Whitaker-Azmitia, 2001; Sleight, 1991).

Niveles insuficientes o excesivos de serotonina durante el periodo postnatal temprano provocan cambios de largo plazo en la plasticidad cerebral (Cases y cols., 1996; Upton y cols., 1999), disminución en la densidad de las espinas dendríticas (Yan y Haring, 1997) y reducción en la plasticidad de corto plazo en el giro dentado (Haring y Yan, 1999).

La idea de que el periodo postnatal temprano es crítico para el establecimiento de una conducta ansiosa a lo largo de la vida está bien fundamentada. En los humanos, hay evidencias que sugieren que la presencia o exposición a estresores en las etapas tempranas del desarrollo incrementan la susceptibilidad a la

ansiedad y desórdenes conductuales en la vida adulta (Tweed y cols., 1989; Kendler y cols., 1992).

Hay evidencias que sugieren que el receptor 5-HT_{1A} está presente en el desarrollo temprano y está involucrado en la regulación del desarrollo del sistema serotoninérgico (Bar-Peled y cols., 1991; Hillion y cols., 1993). Experimentos en ratas preñadas han demostrado que la exposición en el útero a la PCPA, la cual elimina serotonina en el cerebro de rata (Lauder y cols., 1985; Sanders-Bush y cols., 1972, 1974), reduce la expresión post-natal de los receptores 5-HT_{1A}, sugiriendo que el sistema es auto-regulado (Lauder y cols., 2000). Los receptores 5-HT_{1A} aparentemente pueden ser funcionales antes del nacimiento, por lo que, ellos pueden regular al alza o a la baja los niveles cerebrales, tanto de serotonina como de otros neurotransmisores en la etapa fetal (Lauder y cols., 2000; Whitaker-Azmitia y cols., 1990). En el feto humano, la expresión del mRNA del 5-HT_{1A} ocurre durante el desarrollo del cerebro y declina después de su maduración. Este fenómeno se ha reportado en el tallo cerebral (Hillion y cols., 1993), como en el cerebelo (Daval y cols., 1987) y la corteza visual (Dyck y Cynader, 1993).

Se han realizado pocos estudios para analizar la conducta de ansiedad tomando en cuenta la variante de la edad en los sujetos experimentales. Un estudio preclínico en ratas usando el modelo de enterramiento defensivo en sujetos de diferentes edades, muestra que compuestos 5-HT_{1A} reportados como ansiolíticos, tienen efectos variables dependiendo de la edad (López-Rubalcava, 1996). En este estudio, se reporta que ratas de 3 semanas presentan niveles bajos de ansiedad que no hay diferencias entre los grupos control y los tratados con fármacos agonistas que actúan en el receptor 5-HT_{1A}. En cambio, en animales de entre 9 y 11 semanas de edad estos fármacos tienen un efecto ansiolítico, mismo que se va perdiendo conforme aumenta la edad y que sólo se mantiene con algunos fármacos (López-Rubalcava, 1996). Este trabajo es uno de los pocos realizados en animales de distintas edades. Aún no hay claridad en la relación –si esta existe- entre los efectos de los diferentes fármacos y la edad de los sujetos.

CAPÍTULO 4

SEROTONINA Y ANSIEDAD

4.1. DEFINICIÓN DE ANSIEDAD

La ansiedad se puede definir como un estado emocional desagradable en el que hay sensaciones de peligro amenazador, caracterizado por malestar, tensión o aprehensión cuya causa no es identificada. La ansiedad va acompañada de un patrón característico de activación del sistema nervioso autónomo, que incluye una frecuencia respiratoria aumentada, un aumento del ritmo cardiaco, palidez, sequedad de boca, aumento en la sudoración y trastornos músculo-esqueléticos con un consecuente temblor y sensaciones de debilidad (Kaplan y Sadock, 1992). La ansiedad es un estado caracterizado por excitación y vigilia excesiva que se presenta en ausencia de un estímulo amenazante inmediato (Nestler, 2001).

La ansiedad no es una enfermedad, pero se le considera como tal cuando se vuelve tan intensa y persistente que llega a interferir con el funcionamiento cotidiano (Rice, 1997).

La preocupación y la ansiedad están muy relacionadas con el temor, pero surgen de situaciones desagradables que pueden ser imaginarias o reales (Moore y cols. 1990). El miedo es una respuesta adaptativa al estrés agudo provocado por un estímulo potencialmente dañino (interno o externo), que amenaza perturbar la homeostasis. Sin embargo, cuando es desproporcionado en cuanto a intensidad, crónico, irreversible, o no está asociado a un riesgo genuino, puede ser síntoma de un estado patológico de ansiedad: por ejemplo, fobia social, ataques de pánico o desorden generalizado de ansiedad (Millan, 2003).

El estudio de los desórdenes de ansiedad se enfrenta a muchas dificultades, la mayor de las cuales es la ausencia de un parámetro concreto que refleje "ansiedad" *per se*. Aunque existen "marcadores sustitutos" como el incremento en

la presión arterial, taquicardia, hipertermia y la secreción de glucocorticoides dentro del sistema circulatorio que pueden ser indicadores para la evaluación de la ansiedad (Millan, 2003). Conductualmente existen signos de miedo en los animales que pueden compararse con los signos y síntomas de ansiedad en los seres humanos y que son muy útiles en la investigación [exploración y vigilancia, aumento en la respuesta de sobresalto, micción y/o defecación frecuentes (diarrea), aumento del acicalamiento, periodos de inmovilidad (“congelamiento”), nerviosismo, impaciencia (Purves y cols., 2001).

4.2 CLASIFICACIÓN DE LA ANSIEDAD

Es posible hallar los criterios adecuados para la descripción, el diagnóstico y el tratamiento de los desórdenes mentales más comunes en el Manual de Estadística y Diagnóstico de Desórdenes Mentales (*cuarta edición DSM-IV*) que es publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría en Washington D.C. (1994).

Según este manual (DSM-IV) los trastornos de ansiedad se clasifican en:

- Trastornos fóbicos (o neurosis fóbica)

Agorafobia con crisis de angustia

Agorafobia sin crisis de angustia

Fobia social

Fobia simple

- Estados de ansiedad (neurosis de ansiedad)

Trastorno por angustia

Trastorno por ansiedad generalizada

Trastorno obsesivo-compulsivo (o neurosis obsesiva-compulsiva)

Trastorno por estrés postraumático

Agudo

Crónico o retrasado

Trastorno por ansiedad, atípico

4.3 SISTEMA SEROTONÉRGICO Y DESÓRDENES DE ANSIEDAD

Las neuronas serotonérgicas se originan en el núcleo del rafé y proveen proyecciones masivas hacia las estructuras corticolímbicas envueltas en el control de los estados de ansiedad. El núcleo del rafé dorsal (DRN) inerva la corteza frontal, el hipocampo dorsal y la amígdala, mientras que el núcleo del rafé medial (MRN) proyecta principalmente hacia el hipocampo (dorsal y ventral), el septum, el núcleo accumbens y el hipotálamo (Azmitia y Segal, 1978; Deakin y Graeff, 1991; Wilson y cols., 1993; Eison y Eison, 1994; Handley, 1995; Baumgarten y Grozdanovik, 1997; McQuade y Sharp, 1997; Vertes y cols., 1999; Kirby y cols., 2003). Las redes derivadas de estos núcleos muestran un patrón de organización y modulación contrastante entre sí y pueden tener papeles totalmente diferentes en el control de los estados de ansiedad. Por ejemplo, se han implicado específicamente las vías serotonérgicas que emanan del núcleo del rafé dorsal (DRN) en el control de la conducta ansiosa en la prueba de conflicto de Vogel (Azmitia y Segal, 1978; Kosofsky y Mollinver, 1987; Deakin y Graeff, 1991; Wilson y cols., 1993; Netto y cols., 2002; Kirby y cols., 2003; Thiébot y cols., 1983; Pratt, 1992).

Un papel complejo y no uniforme de la serotonina en el control de los desórdenes de ansiedad se ha visto como función de: (1) el origen del estado de ansiedad, si este es provocado por un miedo condicionado o no condicionado y (2) las acciones contrastantes de la serotonina en regiones cerebrales específicas, notablemente la amígdala, que es la región encargada de recibir las señales de peligro potencial y desencadena una serie de reacciones que ayudan a la auto-protección, comparada con la materia gris periacueductal que es el área de la médula espinal en donde se integra el dolor, como una experiencia sensorial (Deakin, 1988, 1991; Deakin y Graeff, 1991; Graeff, 1993, 1996; Eison y Eison, 1994; Handley, 1995; Green y McGregor, 2002). Sin embargo, el papel de la serotonina en la modulación de los estados de ansiedad, puede ser confuso al considerar la influencia potencial de las vías serotoninérgicas, en la función motriz y la impulsividad (Eveden, 1999; Meneses, 1999; Dalley y cols., 2002; Harro, 2002).

Las vías serotoninérgicas que inervan estructuras como la corteza frontal, la amígdala, el hipotálamo y el hipocampo son activados por estímulos ansiogénicos, incluyendo el estrés social, el miedo condicionado y procedimientos de conflicto (Pratt, 1992; Wright y cols., 1992; Adell y cols., 1997; Amat y cols., 1998; Berton y cols., 1998; Martinez y cols., 1998; Beaufour y cols., 2001; Ishida y cols., 2002; Miura y cols., 2002). Por ejemplo, se ha demostrado que la respuesta en pruebas de condicionamiento, como la prueba de Vogel, está acompañada por un incremento en la liberación de serotonina en el hipocampo (Matsuo y cols., 1996).

También se ha observado que humanos con una densidad baja de receptores 5-HT_{1A} son más ansiosos que los grupos con densidades normales (Tauscher y cols., 2001; Condren y cols., 2002). Estas observaciones coinciden con los hallazgos en ratones carentes del receptor 5-HT_{1A}, los cuales generalmente muestran un fenotipo ansioso y un aumento en la sensibilidad al estrés como respuesta tanto a variables conductuales como autonómicas (Heisler y cols., 1998). Los agonistas del receptor 5-HT_{1A} como la buspirona y la gepirona tienen propiedades ansiolíticas, tanto en humanos como en modelos animales (Hervás y Artigas, 1998). Aunado a esto, estudios preclínicos indican que otros agonistas del

receptor 5-HT_{1A} como la 8-hidroxi-di-n-propil-aminotetralina (8-OH-DPAT) y el indorrenato muestran un efecto ansiolítico. Por otro lado, hay resultados que muestran que antagonistas no selectivos del mismo receptor como el WAY100635 y el pindolol, reducen la latencia de acción de la fluoxetina, un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS) y aumentan su efecto ansiolítico. Todo esto indica que los fármacos que actúan sobre el receptor 5-HT_{1A} tienen una importante participación en el control de la ansiedad y que su acción es variable.

Parece ser que los receptores 5-HT_{1A} tanto pre- como post-sinápticos están involucrados en los efectos ansiolíticos de estos fármacos. La actividad ansiolítica de estos compuestos puede ser el resultado de la reducción de la transmisión serotoninérgica mediada ya sea por la activación de los receptores 5-HT_{1A} somatodendríticos por una acción antagonista de los compuestos en los receptores 5-HT_{1A} post-sinápticos (Picazo y cols., 1995).

CAPÍTULO 5

MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD

Para el estudio preclínico de la ansiedad es necesario contar con modelos animales que reflejen las características físicas y conductuales que están presentes cuando se padece este desorden. Existen diferentes modelos de ansiedad en roedores ampliamente usados que pueden dividirse en dos grandes grupos, (1) aquellos que modelan las características de la ansiedad y (2) los que modelan estados de ansiedad. Los primeros incluyen los estados de ansiedad de largo plazo y los últimos los estados ansiosos agudos (figura 7).

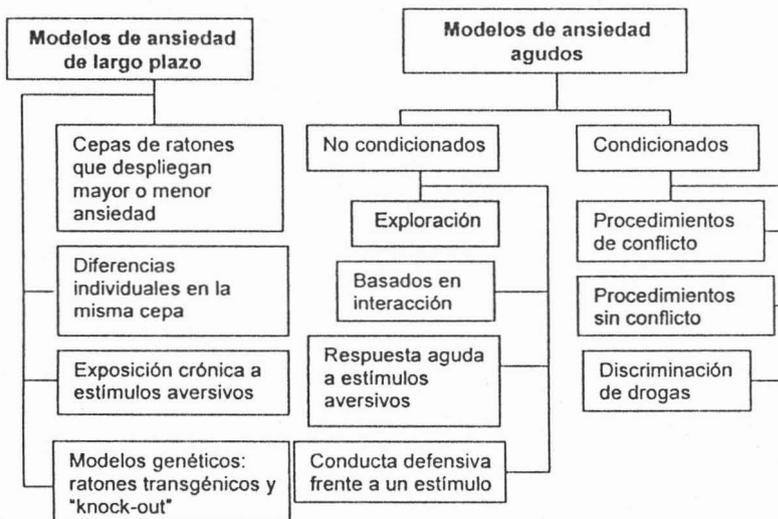


FIGURA 7.- MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ANSIEDAD. TOMADA DE MILLAN, 2003.

5.1 MODELO DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO

El modelo de enterramiento defensivo es una prueba condicionada que se basa en un procedimiento que no representa conflicto para el animal. La prueba explota la tendencia innata de los roedores a explorar lugares novedosos y a enterrar para ocultar los estímulos que identifica como

peligrosos, por ejemplo un depredador. En este modelo, el animal es colocado en una caja de acrílico de dimensiones iguales a las cajas de residencia, con una cama de aserrín fino. La caja contiene un electrodo de una longitud aproximada de siete centímetros en una de sus paredes que transporta una corriente de 0.3mA. La prueba tiene una duración de diez minutos. Al hacer contacto con el electrodo el ratón recibe una descarga eléctrica identifica al estímulo como aversivo y despliega la conducta de enterramiento defensivo. Los parámetros conductas seleccionados para cuantificarse son: (1) El tiempo acumulativo de *enterramiento defensivo*, desplazamiento del material de cama por movimientos rápidos de las patas delanteras y la cabeza alrededor del electrodo. Este parámetro refleja directamente los niveles de ansiedad, es decir, a mayor enterramiento mayor nivel de ansiedad y a menor enterramiento menor nivel de ansiedad. (2) *Latencia de enterramiento*, tiempo que transcurre entre el primer choque recibido y el despliegue de la conducta defensiva de enterramiento. Este parámetro refleja de manera inversa la reactividad del sujeto, es decir a mayor latencia menor reactividad y a menor latencia mayor reactividad. (3) Número de levantamientos del cuerpo en dos patas en posición vertical (*rearings*), haciendo movimientos de olfateo con la nariz hacia arriba en el aire. Este parámetro es un indicador de la actividad locomotora del animal. (4) *Exploración del electrodo* posición orientada hacia la fuente del estímulo aversivo, que en este caso es el electrodo. Se considera que este parámetro es un indicador de la ansiedad y el temor. Es decir, si el animal le teme al electrodo lo explorará poco o al contrario si no le teme lo explorará más. (5) *Número de choques* recibidos por el contacto con el electrodo a largo de la prueba. Al igual que el número de exploraciones también refleja el temor o la ansiedad, si el animal no se acerca al electrodo por "miedo" hay menos posibilidades de que se de un choque eléctrico. (6) *Grado de choque* o intensidad del choque recibido por el sujeto, este parámetro nos señala la respuesta que los animales tienen al recibir un choque eléctrico, la cual se identifica con el movimiento que el ratón tiene después del choque. Es un indicador de los niveles de sensibilidad al dolor, es decir, un grado de choque alto refleja mayor nocicepción (De Boer y cols., 2002; Reynolds y Berridge, 2001; Pinel y Treit, 1978; Peacock y Wong, 1982; Tsuda y cols., 1988; Monser y Treit, 1983; Treit y cols., 1986; De Boer y cols., 1990).

PARÁMETROS		ÍNDICE FISIOLÓGICO
Conductuales:		
Enterramiento defensivo (frecuencia/duración)	Incremento	Miedo/ansiedad, activa (pelea)
Latencia de enterramiento (tiempo)	Decremento	Reactividad/ansiedad
Reactividad hacia el choque (escala de intensidad)		Sensibilidad al dolor/reactividad
Contactos con el electrodo (número/duración)	Decremento	Exploración/ Ansiedad
Rearing (frecuencia/duración)		Exploración, intentos de escape (huída)
Fisiológicos:		
autonómicos/endócrinos		
Ritmo cardíaco	Incremento	Estrés
Presión sanguínea	Incremento	Estrés
Temperatura central	Incremento	Estrés
Noradrenalina en plasma	Incremento	Estrés
Adrenalina en plasma	Incremento	Estrés
Corticosterona en plasma	Incremento	Estrés
Prolactina en plasma	Incremento	Estrés
Glucosa en plasma	Incremento	Estrés

TABLA 1.- PARÁMETROS AFECTADOS EN LA PRUEBA DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO. TOMADA DE MILLAN, 2003.

5.2 MODELO DE TRANSICIONES LUZ/OSCURIDAD

La prueba de transiciones luz/oscuridad está basada en la aversión innata de los roedores a las áreas intensamente iluminadas y en la conducta exploratoria de los roedores en respuesta a estímulos novedosos (Crawley y Goodwin, 1980). El conflicto está entre la tendencia a explorar y la tendencia inicial a evitar lo no familiar (neofobia) e iluminado. La actividad exploratoria refleja el resultado combinado de estas tendencias en situaciones novedosas (Bourin y Hascoët, 2002).

El modelo consiste en una caja de prueba que está dividida en dos partes, la más grande, de dos terceras partes del tamaño total es iluminada con una lámpara de luz blanca e intensa, mientras que la otra parte esta pintada de negro y tiene un techo que la mantiene oscura manteniendo en contacto ambas áreas por medio de una puerta pequeña que solo permite el paso de un ratón. En esta prueba, cuando un fármaco aumenta la actividad en la sección iluminada, esto puede representar un índice de ansiedad. Un incremento en las transiciones sin un incremento en la locomoción espontánea es considerado como un reflejo de la actividad ansiolítica. Es importante hacer notar que este efecto es observado solamente en ciertas cepas de ratón o con el empleo de ciertos fármacos. (File, 1992; Njung'e y Handley, 1991; Treit, 1990; De Vry y cols., 1993). Los parámetros registrados y evaluados son (1) el número de transiciones entre ambas cámaras y (2) el tiempo de permanencia en la cámara iluminada (Crawley y Goodwin, 1980; Costall y cols., 1989; Crawley y cols., 1984; Imaizumi y cols., 1994).

CAPÍTULO 6

6.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que el receptor 5-HT_{1B} regula la liberación de serotonina y se reporta que densidades altas de este receptor inducen conductas ansiosas, también se conoce que los ratones carentes del receptor 5-HT_{1B} presentan niveles menores de ansiedad que la cepa de ratones WT.

Dado que el sistema serotoninérgico participa activamente en la regulación de la ansiedad y su actividad cambia de acuerdo con el desarrollo del individuo, es importante establecer si la edad puede influir en la expresión de la ansiedad en los ratones KO-1B.

6.2 HIPÓTESIS

Dado que se ha reportado que los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1A} comparten varias funciones y que en los ratones KO-1B la sensibilidad al receptor 5-HT_{1A} puede estar modificada, es posible que la acción de un ansiolítico serotoninérgico 5-HT_{1A} pueda cambiar en ratones KO-1B y también es posible que haya diferencias en las acciones de compuestos 5-HT_{1A} dependiendo de la edad del individuo. Además, si existen diferencias en los niveles de serotonina en los sujetos de distintas edades es posible que existan diferencias en los niveles de ansiedad que estos desarrollan.

6.3 OBJETIVOS:

6.3.1 OBJETIVOS GENERALES

Un primer objetivo es determinar si hay diferencias en los niveles basales de ansiedad entre ratones carentes del receptor 5-HT_{1B} y los ratones WT,

mediante el empleo de dos modelos diferentes de ansiedad y de existir analizar tales variaciones se modifican de acuerdo con la edad del animal.

Un segundo objetivo será el de analizar si existen cambios en la sensibilidad a ansiolíticos 5-HT_{1A} en ratones carentes del receptor 5-HT_{1B} de diferentes edades.

6.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar los niveles basales de ansiedad en los ratones KO-1B y su cepa control WT a las edades de uno, tres y seis meses en el modelo de enterramiento defensivo y el paradigma de luz/oscuridad.
- 2) Determinar si hay diferencias en el efecto ansiolítico del fármaco 5-HT_{1A}, 8-hidroxi-2-di-n-dipropilaminotatrelinea (8-OH-DPAT) entre los ratones KO-1B y su cepa control WT de uno, tres y seis meses de edad en el modelo de enterramiento defensivo, el paradigma de luz/oscuridad y el modelo de campo abierto.

CAPÍTULO 7

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 SUJETOS EXPERIMENTALES

En este estudio se emplearon ratones macho de la cepa 129/Sv "Wild type" (WT) y knockout del receptor 5-HT_{1B} (1B-KO) de 1, 3 y 6 meses de edad. Los ratones fueron mantenidos en cajas de acrílico transparentes estándar de laboratorio (26 x 12 x 14 cm) en el cuarto de las colonias, adyacente al cuarto de experimentación. Los ratones tuvieron libre acceso a alimento y agua y estuvieron sometidos a un ciclo de luz/oscuridad invertido de 12/12 horas (la iluminación inició a las 22:00h). Las pruebas fueron realizadas durante la fase de oscuridad entre las 11:00 y las 16:00h. Los animales fueron agrupados según su cepa, su edad y el tratamiento farmacológico al que fueron sometidos.

7.2 PRUEBAS CONDUCTUALES

1) Prueba de enterramiento defensivo:

El modelo consiste en una caja de acrílico idéntica a la de residencia, en una de sus paredes tiene un electrodo que lleva una corriente eléctrica de 0.3mA y mide 6-7cm de largo. El piso de la caja está cubierto con aserrín fino. Se coloca al ratón dentro de la cámara experimental y su conducta es grabada durante 10 minutos. Posteriormente, se registran el tiempo acumulativo de enterramiento, el tiempo de latencia de enterramiento, el número de exploraciones al electrodo, el número y la intensidad de los choques; todo de acuerdo con lo descrito en el capítulo 5.

2) Prueba de luz/oscuridad

El modelo consiste en una caja de acrílico con las siguientes dimensiones 43.5 x 29.5 x 20 cm. La caja se divide en dos secciones, una de 1/3 del tamaño de la caja y de color negro, completamente oscura, la otra de 2/3 de tamaño con iluminación intensa. Hay una pared que divide las dos secciones y tiene una abertura por la que el ratón puede transitar libremente de un compartimiento a otro. El animal se coloca dentro de la cámara en el lado iluminado y se registra su conducta durante 10 minutos. Se contabiliza el número de transiciones que el animal realiza entre las dos secciones y el tiempo que éste permanece en el área iluminada.

3) Prueba de Actividad locomotora en campo abierto:

La prueba de actividad locomotora se realiza en una caja de acrílico transparente (50 x 40 x 20 cm) dividida en doce secciones del mismo tamaño y se contabiliza el número total de cuadros recorridos, lo cual da un índice de su condición motora, esta prueba también dura diez minutos.

7.3 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Los ratones de ambas cepas fueron divididos por edad en grupos de 1, 3 y 6 meses. Cada categoría fue subdividida por su tratamiento en tres; el primero, grupo control, tratado con solución salina, el segundo tratado con 8-OH-DPAT a la dosis de 0.125mg/kg y el tercero con 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25mg/kg. El fármaco fue administrado intraperitonealmente en un volumen de 5ml/kg. La administración fue aguda y a los 20 minutos de realizada, los ratones fueron sometidos a las pruebas conductuales. Todos los grupos fueron formados por un número constante de ratones (n=8-16).

Tabla 2. ANIMALES EMPLEADOS EN LAS PRUEBAS CONDUCTUALES AGRUPADOS POR CEPA, EDAD Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

WT	8-OH-DPAT (mg/kg)			1B-KO	8-OH-DPAT (mg/kg)		
1 MES	0.0	0.125	0.25	1 MES	0.0	0.125	0.25
3 MESES	0.0	0.125	0.25	3 MESES	0.0	0.125	0.25
6 MESES	0.0	0.125	0.25	6 MESES	0.0	0.125	0.25

TABLA 2.- Muestra los 18 grupos de animales empleados en la prueba de enterramiento defensivo. Otros equivalentes fueron empleados en la prueba de luz/oscuridad y la actividad locomotora. Agrupaciones formadas por cepa, edad y tratamiento farmacológico.

7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el paquete de computo SigmaStat. Se utilizó para el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, la prueba de "Kruskal-Wallis" y la ANOVA de dos vías. Además de la "U" de Mann-Whitney como prueba pareada.

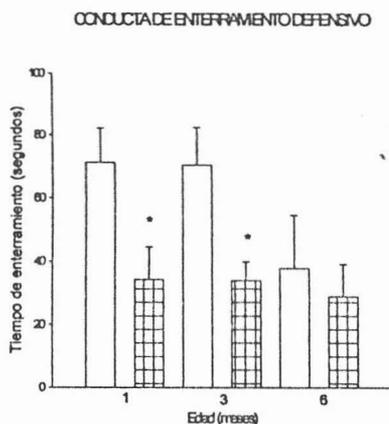
CAPÍTULO 8

RESULTADOS

8.1. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES BASALES DE ANSIEDAD EN RATONES WT Y KO-1B EN LOS MODELOS DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO Y LUZ/OSCURIDAD.

La figura 8 muestra los niveles basales de ansiedad de los ratones KO-1B y WT a las edades de uno, tres y seis meses. En el panel A se muestra que los ratones KO-1B de uno y tres meses de edad expresan menor conducta de enterramiento que los ratones WT de las mismas edades. Sin embargo, en ratones de seis meses de edad, se pierde la diferencia entre cepas. El ANOVA de dos vías señala diferencias en la interacción cepa x edad (Factor cepa DF=1, $F=8.779$, $P=0.004$; Factor edad DF=2, $F=1.535$, $P=0.222$; Cepa x Edad DF2, $F=0.812$, $P=0.448$). En el panel B se compara la latencia de enterramiento entre las cepas KO-1B y WT. El ANOVA de dos vías señala que no hay diferencias significativas por edad, ni por cepa, ni en la interacción cepa x edad (Factor cepa DF=1, $F=0.032$, $P=0.858$; Factor edad DF=2, $F=4.241$, $P=0.060$; Cepa x Edad DF2, $F=1.435$, $P=0.245$).

(A)



(B)

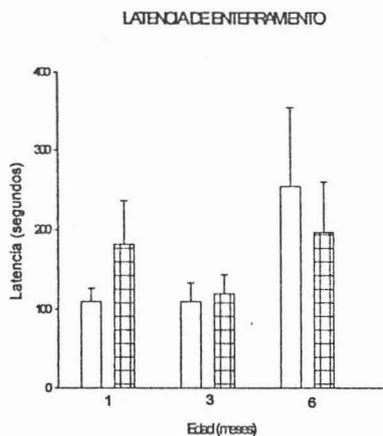


FIGURA 8.- Conducta defensiva de enterramiento (panel A) y latencia de enterramiento (panel B) en ratones WT (barras blancas) y KO-1B (barras cuadrículadas) administrados con solución salina. Se muestra la media \pm EE (n=10-15). La comparación estadística hecha entre los grupos fue la "U" de Mann-Whitney. (* $p < 0.05$).

En la tabla 3 se observa el número de exploraciones al aire y de exploraciones dirigidas al electrodo, realizadas por los ratones KO-1B y WT. En general, los ratones KO-1B muestran un mayor número de "rearings" en comparación con los ratones WT, existiendo diferencia significativa únicamente entre los ratones KO-1B y WT de seis meses de edad (ANOVA de dos vías para número de "rearings": Factor cepa DF=1, $F=13.747$, $P < 0.001$; Factor edad DF=2, $F=0.16$, $P=0.852$; Cepa x Edad DF2, $F=0.148$, $P=0.862$). En relación a las exploraciones hacia el electrodo realizadas por los ratones, el ANOVA de dos vías señala diferencias significativas tanto en edad como en cepa y su interacción (ANOVA de dos vías para el número

de exploraciones: Factor cepa DF=1, F=9.343, P=0.003; Factor edad DF=2, F=8.270, P<0.001; Cepa x Edad DF2, F=3.772, P=0.027). Si comparamos cada grupo con su respectivo control, se puede ver que los ratones KO-1B muestran mayor número de exploraciones a la edad de uno y seis meses en comparación con los ratones de la cepa WT. Sin embargo, no hubo diferencias entre los ratones de tres meses de edad.

Tabla 3.- NÚMERO DE "REARINGS" Y DE EXPLORACIONES HACIA EL ELECTRODO REALIZADAS POR LOS RATONES DE LOS GRUPOS CONTROL WT Y KO-1B DE 1, 3 Y 6 MESES DE EDAD.

Cepa/ Eda	NÚMERO DE REARINGS		EXPLORACIONES HACIA EL ELECTRODO	
	WT	KO	WT	KO
1 mes	16.6± 4.2	28.6± 5.4	10.7 ± 0.7	16.8 ± 3.0*
3 meses	16.4 ± 2.2	29.0 ± 4.1	8.8 ± 0.8	8.6 ± 0.8
6 meses	16.6 ± 4.3	32.2 ± 3.4*	7.3 ± 0.7	12.2 ± 1.2*

TABLA 3.- Muestra el número de "rearings" y exploraciones dirigidas hacia el electrodo realizados en la prueba de enterramiento defensivo por los ratones KO-1B y WT de 1, 3 y 6 meses de edad, tratados con solución salina. Se indican los valores medios ±EE (n=10-15). Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba "U" de Mann-Whitney (*p<0.05).

En la tabla 4 se muestran el número y la intensidad de los choques recibidos por los ratones KO-1B y WT en condiciones basales. En este caso, los ratones KO-1B de seis meses de edad recibieron un número significativamente mayor de choques que los WT de la misma edad. No hubo diferencia entre las dos cepas con relación al grado de los choques recibidos (ANOVA de dos vías para el número de

choques: Factor cepa DF=1, F=5.528, P=0.020; Factor edad DF=2, F=0.77, P=0.466; Cepa x Edad DF2, F=1.041, P=0.35).

Tabla 4. NÚMERO Y GRADO DE CHOQUES RECIBIDOS POR LOS RATONES WT Y KO-1B DE LOS GRUPOS CONTROL DE 1, 3 Y 6 MESES DE EDAD.

Edad/ Cepa	Número de choques		Grado de choque	
	WT	KO	WT	KO
1 mes	3.3 ± 0.3	3.7 ± 0.7	1.1 ± 0.82	1.1 ± 0.04
3 meses	2.6 ± 0.3	3.3 ± 0.3	1.2 ± 0.05	1.0 ± 0.02
6 meses	2.2 ± 0.3	4.2 ± 0.9*	1.2 ± 0.11	1.3 ± 0.09

TABLA 4. Muestra el número de choques y el grado de estos, recibidos por los ratones KO-1B y WT de 1, 3 y 6 meses de edad, en la prueba de enterramiento defensivo, administrados con solución salina. Se indican los valores medios ±EE (n=10-15). Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba "U" de Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

La figura 9 muestra el número de cruces que los ratones realizaron entre el compartimiento oscuro y el iluminado en el modelo de ansiedad de transiciones luz/oscuridad. En este caso se ve que los ratones KO-1B de un mes de edad realizan un número mayor de cruces entre las áreas de prueba, sin embargo, en los ratones de tres y seis meses de edad no se encuentran diferencias significativas entre las dos cepas (ANOVA de dos vías para el número de transiciones: Factor cepa DF1, F=6.191, P=0.017; Factor edad DF2, F=1.013, P=0.371; Cepa x Edad DF2, F=2.096, P=0.135).

NÚMERO DE CRUCES BW

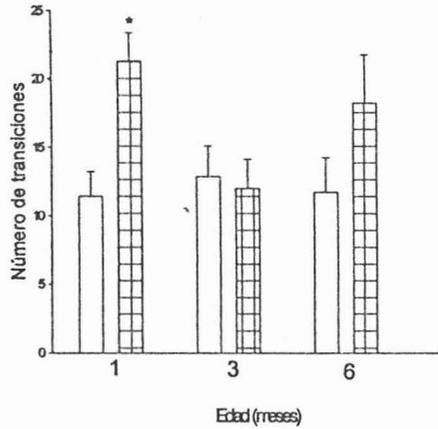


FIGURA 9.- Muestra el número de transiciones entre la cámara oscura y la iluminada en la prueba de luz/oscuridad de los ratones WT (barras blancas) y KO-1B (barras cuadriculadas) de los grupos control de 1, 3 y 6 meses de edad. Se indican los valores medios \pm EE. Las comparaciones estadísticas se realizaron con la prueba "U" de Mann-Whitney (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.001$).

En la figura 10 se muestra la actividad locomotora de los ratones KO-1B en comparación con la actividad de los ratones WT. En este caso, los ratones KO-1B de tres y seis meses de edad muestran mayor actividad que los ratones WT de las mismas edades. Es importante señalar que si sólo se compara la actividad de la cepa WT a las diferentes edades, este parámetro va disminuyendo conforme la edad aumenta. En cambio, en la cepa KO-1B, la tendencia es diferente, siendo mayor la actividad de los ratones de seis meses de edad (ANOVA de dos vías para la actividad locomotora: Factor cepa DF1, $F=26.48$, $P < 0.001$; Factor edad DF2, $F=2.117$, $P=0.131$; Cepa x Edad DF2, $F=4.28$, $P=0.021$).

ACTIVIDAD LOCOMOTORA

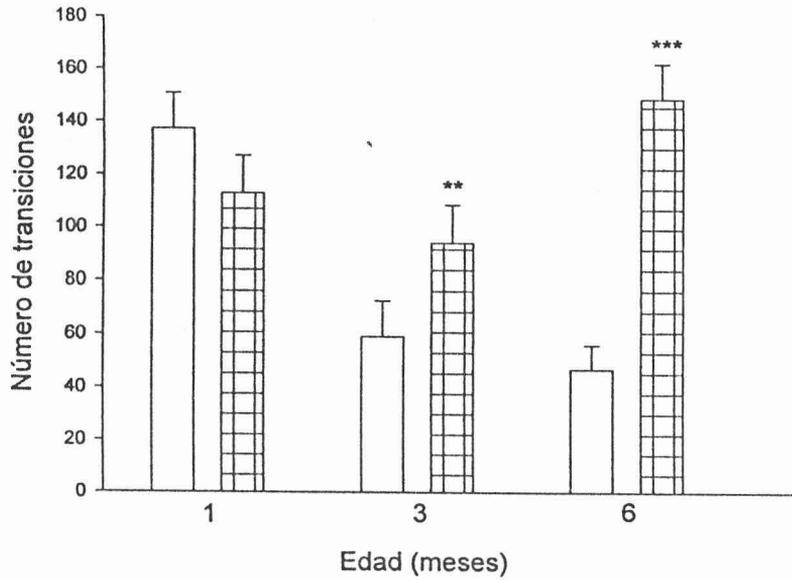


FIGURA 10.- Actividad locomotora de los ratones control WT (barras blancas) y KO-1B (barras cuadriculadas). Se muestran los valores medios de las transiciones de los ratones y su EE. Las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba "U" de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

8.2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ANSIEDAD DE LOS RATONES WT Y KO-1B CON LA ADMINISTRACIÓN DE LA 8-OH-DPAT EN LOS MODELOS DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO Y DE TRANSICIONES LUZ/OSCURIDAD

En la figura 11 se muestran los datos obtenidos en la prueba de enterramiento defensivo con la administración del agonista 5-HT_{1A}, la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25 mg/Kg) en ratones KO-1B y WT a diferentes edades (1, 3 y 6 meses). Como se puede observar en la figura, a la edad de un mes, la 8-OH-DPAT reduce significativamente la conducta de enterramiento a las dosis de 0.125 y 0.25mg/Kg independientemente de la cepa (ANOVA de dos vías para CED en ratones de un mes: Factor cepa DF1, F=3.526, P=0.065; Factor fármaco DF2, F=28.302, P<0.001; Cepa x Fármaco DF2, F=3.713, P=0.030). En ratones WT de tres meses de edad, sólo la dosis de 0.25mg/Kg redujo la conducta de enterramiento. Sin embargo, en ratones KO-1B (de tres meses) este compuesto tuvo un efecto bifásico, incrementando significativamente la conducta a la dosis baja (0.125) y disminuyéndola a la dosis alta (0.25mg/Kg) (ANOVA de dos vías para CED en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, F=0.344, P=0.560; Factor fármaco DF2, F=42.169, P<0.001; Cepa x Fármaco DF2, F=0.275, P=0.761). Finalmente, a la edad de seis meses, la 8-OH-DPAT carece de efecto a las dosis probadas en las dos cepas de ratón (ANOVA de dos vías para CED en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, F=2.0977, P=0.155; Factor fármaco DF2, F=2.058, P=0.140; Cepa x Fármaco DF2, F=5.376, P=0.008).

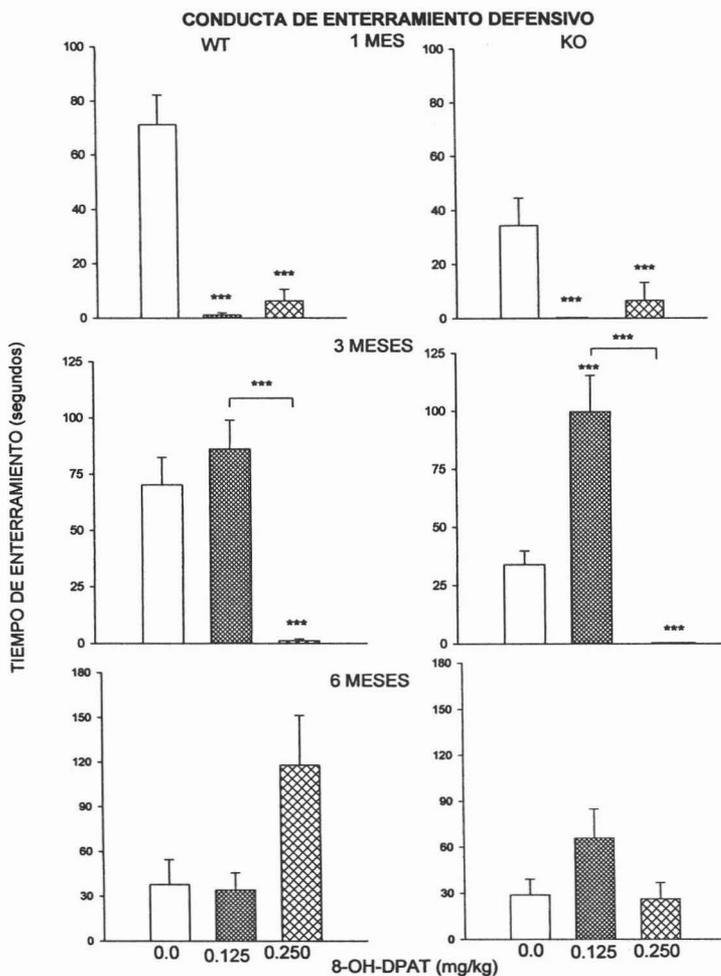


FIGURA 11.- Efecto de la 8-OH-DPAT a la dosis de 0.25mg/kg (barras de cuadros grandes) y 0.125mg/kg (barras de cuadros pequeños) sobre la CED comparado con la dosis control (barras blancas) en ratones WT (izquierda) y ratones KO-1B (derecha) en la prueba de enterramiento defensivo. Se indican la media±EE. La comparación estadística empleada fue el ANOVA de dos vías (** $p < 0.001$).

La figura 12 muestra el efecto de la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) en ratones KO-1B y WT de uno, tres y seis meses de edad, sobre la latencia de enterramiento. En este caso, la 8-OH-DPAT incrementó la latencia de enterramiento de manera dosis-dependiente en ratones de un mes de edad independientemente de la cepa (ANOVA de dos vías para la latencia de enterramiento en ratones de un mes: Factor cepa DF1, $F=0.376$, $P=0.847$; Factor fármaco DF2, $F=122.85$, $P<0.001$; Cepa x Fármaco DF2, $F=1.067$, $P=0.351$). A los tres meses de edad, la dosis de 0.125mg/kg disminuye la latencia de enterramiento en los ratones WT; a la dosis de 0.25mg/kg, aumenta la latencia de enterramiento en ambas cepas (ANOVA de dos vías para latencia de enterramiento en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, $F=6.470$, $P=0.013$; Factor fármaco DF2, $F=111.414$, $P<0.001$; Cepa x fármaco DF2, $F=3.065$, $P=0.052$). Finalmente en ratones de seis meses de edad el fármaco no tuvo efecto significativo en ninguna de las dos cepas (ANOVA de dos vías para CED en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, $F=0.108$, $P=0.744$; Factor Fármaco DF2, $F=0.538$, $P=0.588$; Cepa x Fármaco DF2, $F=3.930$, $P=0.027$).

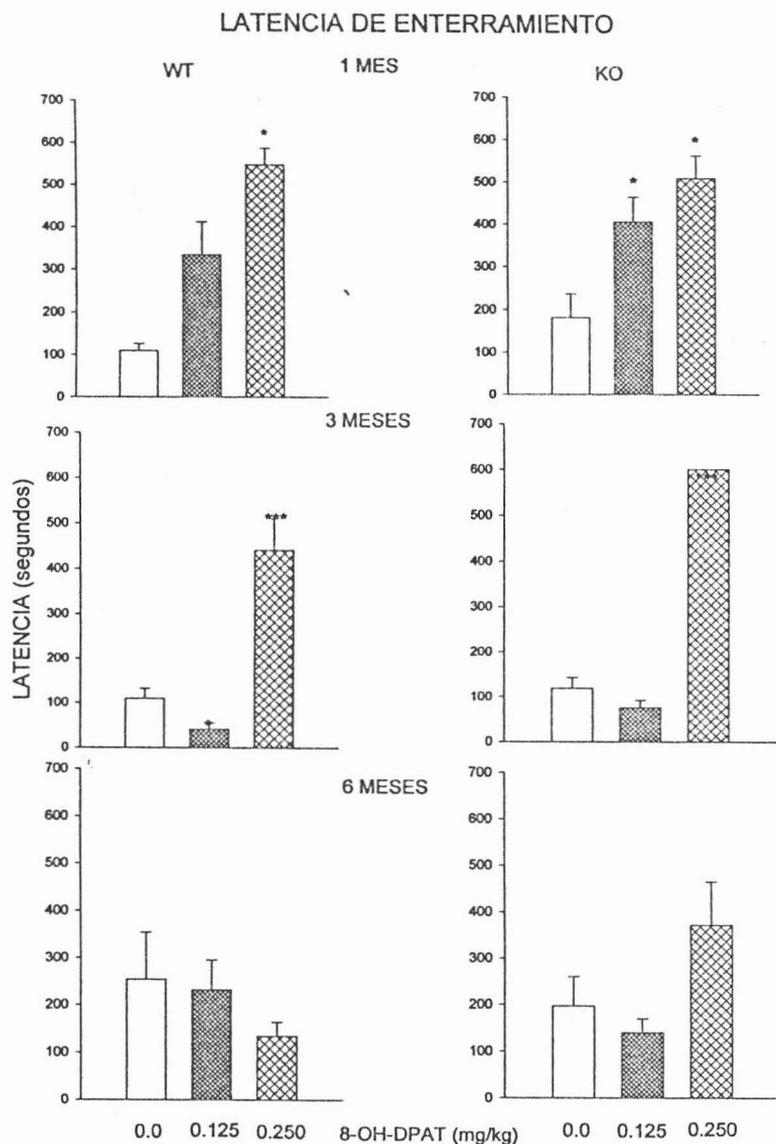


FIGURA 12.- Muestra el efecto de la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) en ratones WT (izquierda) y KO-1B (derecha), de uno, tres y seis meses de edad, sobre el tiempo de latencia de enterramiento. Se indica la media \pm EE. La comparación estadística empleada fue el ANOVA de dos vías seguida de la prueba pareada "U" de Mann-Whitey (* p <0.05; *** p <0.001).

La tabla 5 muestra el efecto de la 8-OH-DPAT sobre el número de exploraciones dirigidas hacia el electrodo. En ratones WT de un mes de edad, el fármaco produce la disminución de la conducta exploratoria de forma dosis-dependiente. Mientras que en los ratones KO-1B de la misma edad, sólo la dosis de 0.25mg/kg disminuye esta conducta (ANOVA de dos vías para le número de exploraciones en ratones de un mes: Factor cepa DF1, $F=8.672$, $P=0.004$; Factor fármaco DF2, $F=13.666$, $P<0.001$; Cepa x Fármaco DF2, $F=1.259$, $P=0.291$). En ratones de tres meses de edad, se puede observar que la 8-OH-DPAT carece de efecto en ratones WT, sin embargo, en los ratones KO-1B, este compuesto aumenta significativamente el número de exploraciones hacia el electrodo (ANOVA de dos vías para le número de exploraciones en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, $F=9.841$, $P=0.002$; Factor fármaco DF2, $F=0.872$, $P=0.422$; Cepa x Fármaco DF2, $F=4.272$, $P=0.017$). Finalmente, a los seis meses de edad no se observa efectos de la 8-OH-DPAT sobre el número de exploraciones realizadas hacia el electrodo en ninguna de las cepas (ANOVA de dos vías para número de exploraciones en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, $F=7.820$, $P=0.008$; Factor fármaco DF2, $F=0.309$, $P=0.736$; Cepa x Fármaco DF2, $F=1.022$, $P=0.369$).

Efecto de la 8-OH-DPAT sobre el número de exploraciones hacia el electrodo						
Dosis (mg/kg)	0.0		0.125		0.25	
Edad/ Cepa	WT	KO	WT	KO	WT	KO
1 mes	10.7 ± 0.7	16.8 ± 3.08	6.29 ± 1.16**	11.14 ± 0.931	4.55 ± 1.39***	5.28 ± 2.17*
3 meses	8.87 ± 3.38	8.64 ± 4.52	8.37 ± 4.4	11.9 ± 3.72*	5.58 ± 5.71	11.63 ± 3.94
6 meses	7.37 ± 2.20	12.28 ± 3.35	10.62 ± 4.77	16.50 ± 7.81	9.77 ± 2.22	14.85 ± 5.64

TABLA 5. La tabla muestra el número de exploraciones dirigidas hacia el electrodo de los ratones KO-1B y WT de 1, 3 y 6 meses de edad, administrados con 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) Se indican los valores medios ±EE (n=10-15). La comparación estadística empleada fue el ANOVA de dos vías seguida de la prueba pareada "U" de Mann-Whitey (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

La tabla 6 presenta el efecto de la 8-OH-DPAT sobre el número de choques recibidos por los ratones WT y KO-1B, de uno, tres y seis meses de edad. En los ratones de un mes de edad, la dosis de 0.125mg/kg de 8-OH-DPAT incrementa significativamente el número de choques recibidos tanto en ratones WT como en KO-1B (ANOVA de dos vías para número de choques en ratones de un mes: Factor cepa DF1, $F=4.036$, $P=0.049$; Factor fármaco DF2, $F=24.954$, $P<0.001$; Cepa x Fármaco DF2, $F=2.893$, $P=0.063$). Con respecto a los ratones de tres meses de edad, se puede ver un efecto bifásico de la 8-OH-DPAT dado que a las dosis de 0.125 mg/kg incrementan el número de choques y a la dosis de 0.25mg/kg carece de efecto. Estos resultados son similares en las dos cepas

(ANOVA de dos vías para número de choques en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, $F=3.122$, $P=0.081$; Factor fármaco DF2, $F=12.181$, $P<0.001$; Cepa x Fármaco DF2, $F=0.971$, $P=0.908$). Finalmente en los ratones de seis meses de edad se puede ver inicialmente que los ratones KO reciben más choques en comparación con la cepa WT. Sin embargo, al comparar el efecto de la 8-OH-DPAT con sus respectivos controles se puede ver que este fármaco carece de efecto independientemente de la cepa (ANOVA de dos vías para número de choques en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, $F=12.514$, $P=0.001$; Factor fármaco DF2, $F=3.263$, $P=0.058$; Cepa x fármaco DF2, $F=5.415$, $P=0.008$).

Dosis (mg/kg)	0.0		0.125		0.25	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO
1 mes	3.35±0.38	3.72±0.7	2.13±0.37	4.14±0.34	6.25±4.19**	6.57±6.57**
3 meses	2.62±0.32	3.32±0.35	5.12±0.95*	6.36±1.08***	2.27±0.50	3.10±0.67
6 meses	2.25±0.36	4.28±0.91	2.75±0.59	7.62±0.99	3.88±0.65	3.71±1.01

TABLA 6.- Muestra el número de choques recibidos que los ratones KO-1B y WT de 1, 3 y 6 meses de edad recibieron, habiendo sido administrados con 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) Se indican los valores medios \pm EE (n=10-15); la comparación estadística empleada fue el ANOVA de dos vías seguida de la prueba pareada "U" de Mann-Whitey ($*p<0.05$; $***p<0.001$).

Por otro lado, la tabla 7 muestra el grado de los choques recibidos en el modelo de enterramiento defensivo. En este caso se puede observar que a ninguna de las edades y en ninguna de las cepas hay efecto del agonista 5-HT_{1A} (ANOVA de dos vías para grado de choques en ratones de un mes: Factor cepa DF1, $F=0.030$, $P=0.863$; Factor fármaco DF2, $F=7.258$, $P=0.001$; Cepa x Fármaco DF2,

F=0.244, P=0.784. ANOVA de dos vías para grado de choque en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, F=3.064, P=0.084; Factor fármaco DF2, F=8.327, P=0.060; Cepa x Fármaco DF2, F=0.361, P=0.361. ANOVA de dos vías para grado de choque en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, F=1.151, P=0.290; Factor fármaco DF2, F=0.897, P=0.450; Cepa x Fármaco DF2, F=0.609, P=0.549).

Dosis(mg/kg)	0.0		0.125		0.25	
Edad/Cepa	WT	KO	WT	KO	WT	KO
1 mes	1.19±0.08	1.09±0.04	1.32±0.12	1.39±0.06	0.68±0.28	0.78±0.37
3 meses	1.19±0.05	1.14±0.02	1.45±0.12	1.34±0.07	1.21±0.11	1.17±0.08
6 meses	1.21±0.11	1.31±0.09	1.13±0.07	1.35±0.11	1.39±0.10	1.37±0.17

TABLA 7.- Efecto de la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) sobre el grado de choque tanto en ratones WT como 1B-KO de diferentes edades (1, 3 y 6 meses) en el modelo de enterramiento defensivo. Se indican los valores medios ±EE (n=10-15); la comparación estadística empleada fue el ANOVA de dos vías seguida de la prueba pareada "U" de Mann-Whitey (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$).

La figura 13 muestra el efecto de la 8-OH-DPAT sobre el número de exploraciones al aire presentado por los ratones durante la prueba de enterramiento. En este caso se puede ver que en ratones de un mes de edad, el fármaco carece de efecto independientemente de la cepa cuando se compara con su respectivo grupo control (ANOVA de dos vías para "rearings" en ratones de un mes: Factor cepa DF1, F=2.081, P=0.158; Factor fármaco DF2, F=13.453, P<0.001; Cepa x Fármaco DF2, F=0.492, P=0.615). En ratones KO-1B y WT de tres meses de edad, la dosis de 0.25mg/kg del agonista 5-HT_{1A} disminuye significativamente el número de "rearings" (ANOVA de dos vías para número de "rearings" en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, F=18.461, P<0.001; Factor fármaco DF2, F=30.324, P<0.001; Cepa x Fármaco DF2, F=2.551, P=0.085). Finalmente, a los

seis meses de edad se puede observar que el 8-OH-DPAT no tiene efecto sobre el número de "rearings" independientemente de la cepa (ANOVA de dos vías para número de "rearings" en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, $F=14.140$, $P<0.001$; Factor fármaco DF2, $F=0.148$, $P=0.862$; Cepa x Fármaco DF2, $F=1.639$, $P=0.206$).

La figura 14 muestra la actividad locomotora de los ratones WT y KO-1B en la prueba de campo abierto tras la administración de la 8-OH-DPAT a diferentes edades. En ratones de un mes de edad el agonista 5-HT_{1A} disminuye significativamente la actividad a la dosis de 0.25mg/kg en ratones WT, sin embargo, en ratones KO carece de efecto (ANOVA de dos vías para actividad locomotora en ratones de un mes: Factor cepa DF1, $F=0.308$, $P=0.581$; Factor fármaco DF2, $F=8.568$, $P<0.001$; Cepa x Fármaco DF2, $F=1.639$, $P=0.203$). En ratones de tres meses de edad la 8-OH-DPAT aumenta significativamente la actividad locomotora a la dosis de 0.125mg/kg en ratones WT, sin embargo en ratones KO este fármaco carece de efectos (ANOVA de dos vías para la actividad locomotora de ratones de tres meses: Factor cepa DF1, $F=0.716$, $P=0.402$; Factor fármaco DF2, $F=5.964$, $P<0.005$; Cepa x fármaco DF2, $F=2.045$, $P=0.140$). Finalmente a la edad de seis meses el agonista 5-HT_{1A} carece de efecto en ratones WT y disminuye la actividad en ratones KO-1B (ANOVA de dos vías para actividad locomotora en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, $F=54.796$, $P<0.001$; Factor fármaco DF2, $F=8.220$, $P<0.001$; Cepa x Fármaco DF2, $F=1.949$, $P=0.155$).

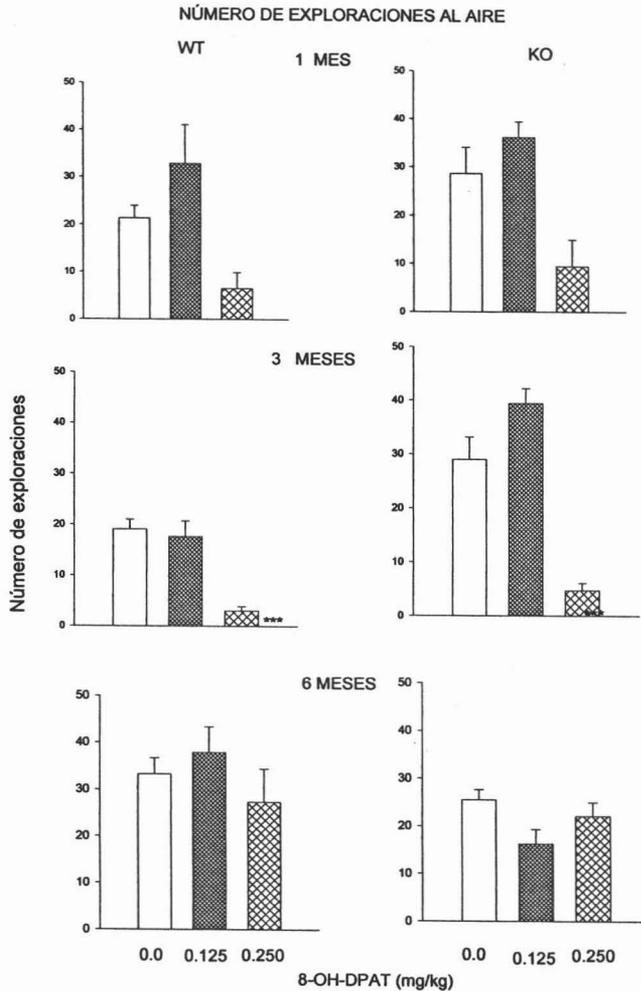


FIGURA 13.- Efecto de la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) sobre el número de "rearings" en los ratones WT (izquierda) y KO-1B (derecha) de 1, 3 y 6 meses de edad. Se indican los valores medios \pm EE (n=10-15). La comparación estadística se realizó con el ANOVA (* $p<0.05$; ** $p<0.02$; *** $p<0.001$).

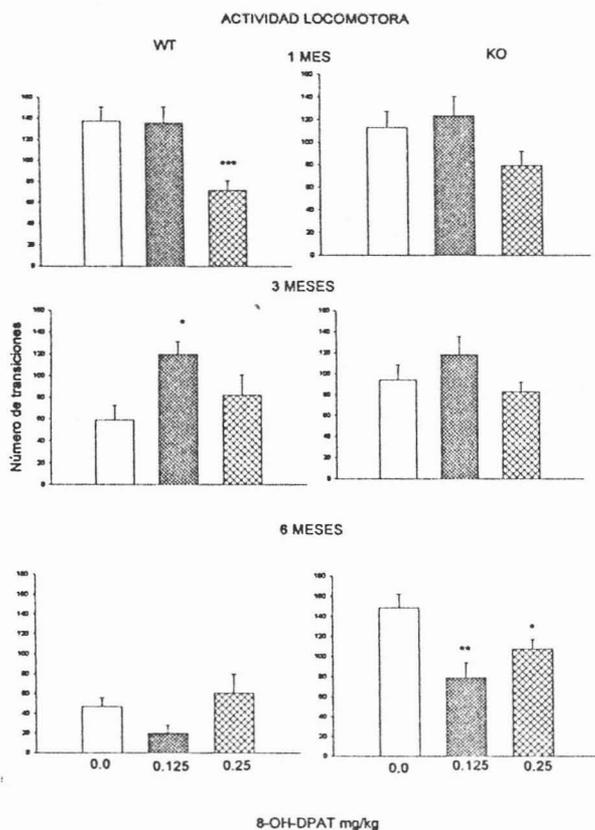


FIGURA 14.- Efecto de la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) sobre la actividad locomotora de ratones WT (izquierda) y 1B-KO (derecha) en la prueba de campo abierto. Se muestra la media \pm EE. La comparación estadística fue hecha con el ANOVA de dos vías (* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.001$) seguida de la prueba pareada "U" de Mann-Whitney.

Por último, la figura 15 muestra el efecto de la 8-OH-DPAT en el modelo de transiciones luz/oscuridad en ratones WT y KO. En este caso se puede observar que el compuesto carece de efecto en este modelo independientemente de la cepa y de la edad (ANOVA de dos vías para el número de transiciones en ratones de un mes: Factor cepa DF1, $F=1.479$, $P=0.230$; Factor fármaco DF2, $F=3.942$, $P=0.026$; Cepa x Fármaco DF2, $F=2.33$, $P=0.108$. ANOVA de dos vías para el

número de transiciones en ratones de tres meses: Factor cepa DF1, $F=1.224$, $P=0.275$; Factor fármaco DF2, $F=5.231$, $P=0.009$; Cepa x Fármaco DF2, $F=7.794$, $P=0.001$. ANOVA de dos vías para el número de transiciones en ratones de seis meses: Factor cepa DF1, $F=18.862$, $P<0.001$; Factor fármaco DF2, $F=0.461$, $P=0.634$; Cepa x Fármaco DF2, $F=0.938$, $P=0.400$).

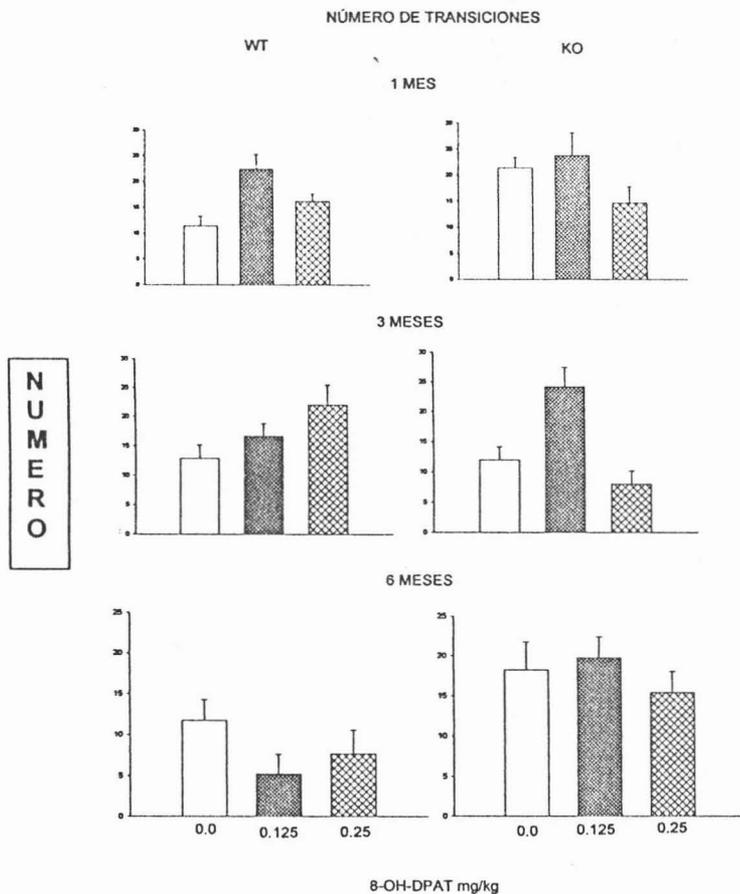


FIGURA 15. Efecto de la 8-OH-DPAT (0.125 y 0.25mg/kg) sobre el número de transiciones entre compartimientos en la prueba de luz/oscuridad en ratones WT (izquierda) y 1B-KO (derecha) de 1, 3 y 6 meses de edad. Se muestra la media \pm EE. ANOVA de dos vías, no significativa.

CAPÍTULO 9

9.1 DISCUSIÓN

9.1.1 DIFERENCIAS BASALES EN ANSIEDAD Y CONDUCTA AMBULATORIA ENTRE RATONES WT Y 1B-KO

Los receptores 5-HT_{1B} tienen una localización anatómica heterogénea dentro del SNC y actúan tanto como auto-receptores como hetero-receptores (Jacobs y Azmitia, 1992). Se considera que estos receptores participan en la regulación de los estados de ansiedad a través del control de la liberación tanto de la serotonina como de otros neurotransmisores, como la acetilcolina y el GABA (Sari, 2004; Aguilar y Brandao, 1996). Así, los receptores 5-HT_{1B} regulan a la baja la liberación de la acetilcolina en el hipocampo, cuya actividad provoca un aumento en los niveles de ansiedad (Maura y Raiteri, 1986; Sari, 2004), a la vez que los receptores localizados en la vía amígdala-periacueductal controlan la liberación de GABA, un neurotransmisor que también está involucrado en la regulación de la ansiedad (Jonson y cols., 2000; Sari, 2004). Por otra parte, se ha visto que el aumento en la expresión de los auto-receptores 5-HT_{1B} induce conductas ansiosas. Así, en estudios previos se ha demostrado que la sobreexpresión de los receptores 5-HT_{1B} en el núcleo del rafe dorsal incrementa las conductas de ansiedad en animales expuestos a estrés usando el modelo de laberinto elevado de brazos abiertos (Clark y cols., 2002). Basándonos en estos antecedentes, se podría pensar que la carencia de los receptores 5-HT_{1B} podría disminuir la conducta de ansiedad.

Para hacer un estudio más profundo sobre las funciones generales del receptor 5-HT_{1B} se crearon los ratones KO-1B, los cuales han servido para caracterizar diversas conductas, entre ellas la de ansiedad. En este caso, nuestros datos muestran que en condiciones basales los ratones KO-1B de uno mes y tres meses de edad, presentan niveles menores de ansiedad que los WT en los modelos de enterramiento defensivo y transiciones luz/oscuridad. Al comparar nuestros resultados con los reportes previos realizados en otros laboratorios observamos que los ratones jóvenes KO-1B resultaron ser menos "ansiosos" comparados con los WT en pruebas como la de campo abierto (Zhuang y

cols., 1999), la de vocalizaciones ultrasónicas (Brunner y cols., 1999) y la prueba de enterramiento defensivo (López-Rubalcava y cols., 2000).

Una de las diferencias entre los diversos modelos de ansiedad reside en la fuente que provoca el estrés, ya que cada vía neurotransmisora puede ser activada de manera distinta (Millan, 2003). Se puede considerar que como no todos los trastornos de ansiedad son iguales, tampoco todos los modelos de ansiedad pueden serlo (Broekkam y cols., 1989). En esta investigación empleamos como modelos de ansiedad el paradigma de enterramiento defensivo y la prueba de luz/oscuridad. Ambos modelos representan estados agudos de ansiedad, son pruebas no condicionadas donde se presenta una conducta exploratoria (Millan, 2003). En el primer caso, los parámetros de ansiedad son la conducta defensiva de enterramiento y el número de choques recibidos por el ratón (Millan, 2003; De Boer y Koolhaas, 2003).

Por otro lado, es interesante señalar que a la edad de seis meses de edad no se encontraron diferencias entre las cepas de ratón independientemente del modelo de ansiedad utilizado. No hay reportes que indiquen la existencia de diferencias por efecto de la edad. Generalmente, en los reportes, no se indican las edades de los sujetos.

Es importante señalar que en su mayoría los autores que trabajan con ratones KO-1B no indican la edad exacta de los sujetos experimentales, sólo muestran el peso y de ahí se puede suponer que son animales adultos. Es por ello que sería difícil determinar si las diferencias encontradas por otros laboratorios, utilizando otros modelos, se deban a los modelos o a la edad de los ratones. El único trabajo que analizó sujetos jóvenes fue el de Brunner y cols. (1999), quienes encontraron que los ratones KO-1B jóvenes son menos "ansiosos" que los WT, empleando el modelo de vocalizaciones ultrasónicas y cuyos resultados concuerdan con los nuestros.

El modelo de enterramiento defensivo además de dar información sobre los niveles de ansiedad, también nos da indicios de la reactividad de los animales a través del parámetro de latencia de enterramiento (De Boer y Koolhaas, 2003). Con esta cuantificación encontramos que los ratones KO-1B son

igualmente reactivos que los WT, independientemente de la edad. Otro parámetro importante en la determinación del estado conductual del ratón es la actividad locomotora, aunque esta medición es realizada a partir de una prueba independiente de las pruebas de ansiedad mediante el modelo de campo abierto. En este caso, la actividad locomotora de los ratones WT disminuye conforme aumenta la edad, mientras que la de los ratones 1B-KO la aumentan a la par que la edad. Para apoyar los resultados obtenidos en la prueba de campo abierto existe un parámetro que muestra la actividad locomotora de los ratones en el modelo de enterramiento defensivo, este es el número de "rearings" (De Boer y Koolhaas, 2003; Treit y cols., 1986). En este estudio encontramos que, en general, los ratones KO-1B son más activos que los WT independientemente de la edad. Finalmente, el grado de choque nos indica que tan sensibles son los ratones al estímulo que se les presenta. En este caso, no encontramos diferencias en los ratones ni por cepa ni por edad.

Es importante señalar que recientemente Buhot reportó diferencias dependientes de la edad entre ratones WT y KO-1B usando la prueba de Morris, la cual implica el despliegue de una habilidad de aprendizaje espacial, memoria y movimiento (natación). Esta autora encuentra que los ratones jóvenes (de 3 meses de edad) KO-1B tienen mayor capacidad de aprendizaje, memoria y movimiento (natación) que los ratones WT. En ratones viejos (de 22 meses de edad) estas diferencias desaparecen en el parámetro de aprendizaje de espacial, sin embargo permanecen en las capacidades motoras y de memoria. Según Buhot y cols., estos resultados indican que la carencia del receptor 5-HT_{1B} provee un efecto protector ante el deterioro de la memoria y del movimiento provocado por el envejecimiento ya que esta capacidad no está dañada en los ratones KO-1B. Nuestros resultados concuerdan con estos reportes, ya que la actividad locomotora de los ratones WT siempre es menor que la de los ratones KO-1B, además de que la actividad locomotora de los ratones WT disminuye con el aumento de la edad. Mientras que en los ratones KO-1B en lugar de ir disminuyendo, se mantiene e inclusive se incrementa con la edad. En cuanto a conductas defensivas relacionadas con la ansiedad, específicamente la conducta de enterramiento, los animales 1B-KO muestran niveles más bajos de ansiedad y estos no se modifican dependiendo de la

edad, sin embargo, en animales WT los niveles de ansiedad sí disminuyen con la edad.

Como observamos mediante el modelo de enterramiento defensivo, los ratones KO-1B tienen niveles de ansiedad disminuidos, pero no su capacidad de enfrentarse a un peligro. En el caso de los ratones WT encontramos el despliegue de una conducta activa frente al estímulo aversivo mientras que la respuesta de los ratones 1B-KO es de evitación. En este punto encontramos que la carencia del receptor 5-HT_{1B} en los ratones no está representando una desventaja ineludible, sino que puede significar la posibilidad de que los sujetos tengan una adaptación conductual después de la modificación genética para enfrentarse a un peligro de manera distinta.

9.1.2 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA 8-OH-DPAT EN MODELOS DE ANSIEDAD Y CONDUCTA AMBULATORIA EN RATONES WT A DIFERENTES EDADES

Dado que se ha observado que el efecto de fármacos serotoninérgicos puede ser modificado dependiendo de la edad de los sujetos experimentales, y dado que el receptor 5-HT_{1A} está muy involucrado en la modulación del desarrollo del sistema serotoninérgico, un segundo objetivo de nuestro trabajo fue el de analizar si el efecto de un fármaco agonista del receptor 5-HT_{1A} puede ser modificado dependiendo de la edad en ratones WT de la cepa Sw-129.

La 8-OH-DPAT ha sido empleada anteriormente en modelos de ansiedad teniendo efectos ansiolíticos. En esta investigación, mediante el empleo del modelo de enterramiento defensivo hallamos que la dosis de 0.125mg/kg de 8-OH-DPAT tiene efecto ansiolítico en los ratones WT de un mes de edad, pero lo pierde a las edades de tres y seis meses, mientras que a la dosis de 0.25mg/kg tiene efecto ansiolítico en ratones de uno y tres meses de edad, sin embargo, en los ratones de seis meses de edad se pierde este efecto.

Otros trabajos han analizado el efecto de la 8-OH-DPAT en ratas de diferentes edades empleando el modelo de enterramiento defensivo (López-Rubalcava y

cols., 1995). En este caso encontraron que la 8-OH-DPAT carece de efecto en animales jóvenes de un mes de edad y que en las ratas las edades de entre dos y tres meses de edad, el fármaco tuvo su efecto ansiolítico mayor. Finalmente, en ratas de poco más de cinco meses de edad, la 8-OH-DPAT continúa teniendo efectos ansiolíticos. La discrepancia con nuestros resultados puede residir en la diferencia de la especie empleada, ya que los ratones tienen un desarrollo más rápido que las ratas y las edades no son del todo equivalentes.

López-Rubalcava y cols. (1995) discuten que la falta de efecto de los fármacos 5-HT_{1A} en las ratas de un mes de edad puede deberse a la falta de conexiones serotoninérgicas debidamente desarrolladas. Se sabe que en humanos la actividad serotoninérgica es alta ya en los primeros dos años de vida, además de que este neurotransmisor es de las primeras monoaminas en estar presente en el cerebro, primero como factor de crecimiento y luego como transmisor neuronal (Whitaker-Azmitia, 2001). Posteriormente, a los cinco años de edad, el sistema serotoninérgico disminuirá su actividad para mantenerse estable durante la vida adulta (Whitaker-Azmitia, 2001). En rata se ha caracterizado el desarrollo de las innervaciones serotoninérgicas corticales y se sabe que las ratas neonatas, tienen una densa innervación serotoninérgica en distintas áreas de la corteza sensorial, además de una serie de parches en el área sensorial-motora. Pero a las tres semanas de edad, estos parches ya no están presentes y las innervaciones serotoninérgicas llegan a disminuir en número, pero a estar más uniformemente distribuidas en la neocorteza de las ratas adultas (D'Amato y cols., 1987). Un estudio sobre la activación del sistema serotoninérgico y el desarrollo de sus redes neuronales en el pollo, indica que el número de fibras serotoninérgicas descendentes en el primer día de nacimiento es elevado y se va incrementando durante la primera semana de edad. Luego, a las dos semanas de nacimiento, la densidad de las fibras serotoninérgicas disminuye considerablemente (33-56%), hasta que a los tres meses de edad, las fibras se han incrementado para conservar una densidad constante durante la vida adulta (Kojima y cols., 1988). Las variaciones encontradas a lo largo del crecimiento en las diferentes especies animales estudiadas son equivalentes y nos muestran que estos cambios han sido

conservados a lo largo de la evolución. En estos hallazgos observamos que el sistema serotoninérgico tiene diferencias en su actividad por efecto de la edad, lo cual hace pensar que la interacción de fármacos serotoninérgicos con un receptor serotoninérgico particular, en este caso con el receptor 5-HT_{1A} también pueda ser modificada como resultado de la edad. De acuerdo con nuestros resultados, esta diferencia existe. Los datos de esta investigación revelan que el efecto ansiolítico de una determinada dosis de la 8-OH-DPAT es mayor en los ratones de menor edad (1 mes) y que éste, se va perdiendo conforme los animales van creciendo (3 meses), hasta desaparecer por completo (6 meses). No es posible establecer una causa única y específica para este cambio en la sensibilidad a la 8-OH-DPAT por efecto de la edad.

Además de mostrar los niveles de ansiedad, el modelo de enterramiento defensivo nos da información, a través del parámetro de latencia de enterramiento de la actividad del animal. Los datos obtenidos muestran que la dosis de 0.125mg/kg de 8-OH-DPAT disminuye la reactividad de los ratones de un mes de edad, en tanto que en ratones de tres y seis meses el fármaco carece de este efecto. A la dosis de 0.25mg/kg, la 8-OH-DPAT disminuye la reactividad de los ratones de uno y tres meses de edad, sin afectar a los ratones de seis meses de edad.

Estos resultados parecen indicar que la sensibilidad de los ratones a la 8-OH-DPAT va disminuyendo con el aumento de la edad tanto en la conducta de ansiedad como en la reactividad.

Además, se puede observar que las dosis de 0.125mg/kg y 0.25mg/kg de 8-OH-DPAT disminuyen el número de exploraciones hacia el electrodo en los ratones de un mes, pero no afecta a los ratones de tres y seis meses de edad. Por otro lado, el grado de los choques recibidos por los ratones nos indica que no hay diferencias en la sensibilidad de estos frente al estímulo aversivo por efecto del fármaco.

Finalmente, a través del parámetro de "rearings" en la prueba de enterramiento defensivo podemos observar que la 8-OH-DPAT a la dosis de 0.125mg/kg no tiene efectos en ninguna de las edades estudiadas. Mientras que la dosis de

0.25mg/kg no tiene efectos en los ratones de un mes de edad, pero sí en los ratones de tres meses, disminuyendo su actividad motora. No obstante, en los ratones de seis meses de edad también carece de efectos. Por otro lado, una prueba de actividad locomotora independiente del modelo de enterramiento defensivo, la prueba de campo abierto, nos muestra que la 8-OH-DPAT a la dosis de 0.125mg/kg carece de efecto.

En tanto la dosis de 0.25mg/kg disminuye significativamente la actividad motora en los ratones de un mes de edad, mientras que en ratones de tres meses de edad la aumenta significativamente; sin afectar a los ratones de seis meses de edad.

Aunque como se menciona arriba, los ratones tratados con el fármaco son menos reactivos que los controles, su sensibilidad es la misma que la de los controles y su actividad locomotora prácticamente no está modificada. Estos resultados nos indican que la 8-OH-DPAT no produce alteraciones motoras que impidan que los ratones realicen la conducta de enterramiento defensivo en el caso de presentar un estado de ansiedad. Además, es de suma importancia recalcar que el efecto de la 8-OH-DPAT observado en el modelo de enterramiento defensivo fue ansiolítico mientras que en el modelo de luz/oscuridad este fármaco carece de efectos sobre los estados de ansiedad. Ya otras investigaciones hacen ver que existen diferencias en el efecto del fármaco empleado dependiendo del modelo de ansiedad utilizado. Así por ejemplo, López-Rubalcava y cols., (1996), Fernández-Guasti y Hong (1989), Treit y cols., (1993) y De Boer (2003) reportan efectos ansiolíticos de la 8-OH-DPAT en el modelo de enterramiento defensivo. Mientras que Bourin (2003) reporta que no hay efectos ansiolíticos con la administración aguda de la 8-OH-DPAT empleando el modelo de luz/oscuridad. Estos reportes son concordantes con nuestros resultados.

9.1.3 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA 8-OH-DPAT EN MODELOS DE ANSIEDAD Y CONDUCTA AMBULATORIA EN RATONES KO-1B A DIFERENTES EDADES

En muchos casos se ha propuesto que la "delección" del gen que codifica para un receptor desde el desarrollo ontogénico pudiera inducir cambios plásticos en otros receptores. De este modo, se han realizado análisis bioquímicos para probar si la carencia del receptor 5-HT_{1B} puede ser "compensada" por el aumento en el número de receptores 5-HT_{1A} a lo largo del desarrollo (Ase y cols., 2001). Dado que ambos receptores están regulando la liberación de la serotonina, esto podría esperarse. Sin embargo, no fue hallado aumento en la densidad de los auto-receptores 5-HT_{1A} en los ratones KO-1B respecto de los WT (Ase y cols., 2001). Por otro lado, algunos estudios muestran que los ratones KO-1B tienen una regulación a la baja de los receptores 5-HT_{1A} durante en desarrollo temprano y una sensibilidad mayor a las benzodiazepinas que los ratones WT (Brunner y cols., 1999). También encontramos reportes que indican que los ratones KO-1B tienen diferencias en la sensibilidad a fármacos 5-HT_{1A} (Rodríguez-Manzo y cols., 2002; El-Khodori y cols., 2004), además de ser más sensibles al tolueno (López-Rubalcava y cols., 2000). Rodríguez-Manzo y cols. (2002) emplearon la 8-OH-DPAT en un modelo de conducta sexual. Encontraron que al administrar este fármaco a ratones WT, estos tenían una conducta copulatoria inhibida. Mientras que en los ratones KO-1B, el mismo fármaco 5-HT_{1A}, sólo produjo una tendencia a reducir el porcentaje de animales que llegaron a la eyaculación. En general, los ratones KO-1B fueron menos sensibles a las acciones inhibitorias de la 8-OH-DPAT que la cepa de ratones WT. Por su parte, López-Rubalcava y cols. (2000) emplearon ratones WT y KO-1B que primero fueron expuestos a diferentes concentraciones de tolueno y luego se probaron en los modelos de ansiedad de laberinto elevado de brazos abiertos y el modelo de enterramiento defensivo. El tolueno produjo efectos ansiolíticos en ambos paradigmas y en ambas cepas. Sin embargo, en los ratones KO-1B, el tolueno surtió sus efectos a concentraciones menores. Podemos indicar que los ratones KO-1B fueron más sensibles a este compuesto. De esta manera, otro de los objetivos de nuestra investigación también fue el verificar si la sensibilidad de los ratones

KO-1B frente al agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT en los modelos de ansiedad y si la conducta ambulatoria era diferente de la presentada por los ratones WT a diferentes edades. Un estudio reciente (2004) de El-Khodor y cols., sometió a prueba a ratones WT y KO-1B de 7-8 días de edad en el modelo de vocalizaciones ultrasónicas y a una prueba de actividad locomotora. Estos autores emplearon diferentes fármacos, entre ellos, la 8-OH-DPAT y hallaron que este fármaco tiene efecto ansiolítico dosis-dependiente, además de que induce hiperlocomoción en ambas cepas. Aunque indican que los ratones KO-1B fueron, en general, menos sensibles a la activación de los receptores 5-HT_{1A} en comparación con los ratones WT de edad temprana.

Se puede observar que la 8-OH-DPAT tiene efecto ansiolítico en ratones de ambas cepas de un mes de edad, podemos decir que los ratones KO-1B son igualmente sensibles a la 8-OH-DPAT que los ratones WT de un mes de edad; sin embargo, los ratones KO-1B de tres meses de edad aumentan su conducta de enterramiento defensivo por efecto de la 8-OH-DPAT con la dosis de 0.125mg/kg, en tanto que esta dosis carece de efecto en los ratones WT. Finalmente, la dosis de 0.25mg/kg tiene efecto ansiolítico en ambas cepas. En los ratones de seis meses de edad, los efectos de las dosis de 0.125 y 0.25mg/kg de 8-OH-DPAT se anulan en ambas cepas de ratón.

9.2 CONCLUSIONES

Comparando los niveles de ansiedad en el modelo de enterramiento defensivo por cepa y en las diferentes edades, se puede observar que mientras que los ratones WT presentan niveles menores de ansiedad con el aumento de la edad, los ratones KO-1B mantienen constantes sus niveles de ansiedad a las diferentes edades. Si se comparan los niveles de ansiedad entre las dos cepas, se puede observar que por lo menos a las edades de 1 y 3 meses, los ratones KO-1B son menos ansiosos que los WT en el modelo de enterramiento defensivo. De manera interesante en el modelo luz/oscuridad no se ven diferencias en los niveles basales de ansiedad dependiendo de la edad. En general los ratones KO-1B tienen menores niveles de ansiedad a los tres y seis meses en comparación con la cepa WT. Estos datos señalan que puede haber variaciones en los niveles de ansiedad entre ratones KO-1B y WT dependiendo del modelo de ansiedad utilizado y dependiendo de la edad de los ratones.

Con respecto a la actividad locomotora basal, se pueden observar diferencias dependientes de la edad en las dos cepas de ratón. Es muy interesante observar que mientras los ratones WT disminuyen su actividad locomotora al tiempo que su edad avanza, los ratones KO-1B contrariamente incrementan su actividad locomotora con el aumento de edad. Estos datos son muy interesantes y abren la posibilidad de estudiar la participación del receptor 5-HT1B sobre la actividad locomotora. Si consideráramos a la disminución de la conducta locomotora por efecto de la edad como un probable efecto degenerativo, entonces la delección del gen que codifica para el receptor 5-HT1A pudiera tener un efecto protector. No obstante, es necesaria la realización de toda una serie de experimentos para poder comprobar esta hipótesis.

Con relación al efecto de la 8-OH-DPAT en los modelos de ansiedad, dado que en ratones WT este compuesto indujo efectos ansiolíticos en el modelo de enterramiento defensivo y careció de efectos en el modelo de luz/oscuridad, se puede pensar que este refleja el hecho de que los modelos de ansiedad pueden representar diferentes tipos de ansiedad y, como sucede en el humano, dependiendo del tipo de ansiedad, un fármaco puede o no tener

efectos positivos. Se deberán hacer estudios futuros para analizar si efectivamente cada modelo representa diferentes tipos de ansiedad y como son modulados fisiológicamente cada uno de estos tipos de ansiedad.

También es importante señalar que en la cepa WT, el efecto de la 8-OH-DPAT se vio modificado con la edad de los ratones a tal grado que en ratones de 6 meses se perdió el efecto de este compuesto. Las razones por las cuales sucede esto son difíciles de explicar, sin embargo, esto señala la importancia de hacer estudios a diferentes edades y verificar si el receptor 5-HT_{1A} sufre algún tipo de cambio con la edad que haga que el efecto de compuestos que actúan sobre los receptores 5-HT_{1A} se pierda. Las implicaciones de estos estudios son importantes ya que en la actualidad se proponen diversos compuestos 5-HT_{1A} para el tratamiento de la ansiedad y otras patologías como son la depresión.

Finalmente, se ha discutido ampliamente la posibilidad de que existan cambios plásticos con la delección de genes que codifican para un receptor en particular durante el desarrollo. Específicamente en el caso de la remoción del receptor 5-HT_{1B} se ha discutido que uno de los receptores que pudiera ser afectado es el 5-HT_{1A} ya que comparten ciertas funciones como es el control de la liberación de serotonina. En general, nuestros resultados muestran que en algunos casos se puede observar que los ratones KO-1B son más sensibles al efecto del agonista del receptor 5-HT_{1A}, sin embargo esto parece depender del modelo estudiado y de la edad de los ratones. Por lo tanto, hay que señalar la importancia de especificar la edad de los sujetos experimentales, sobre todo en aquellos experimentos que utilicen ratones genéticamente manipulados ya que en muchos casos por la poca disponibilidad que se tiene de estos animales se utilizan animales adultos o viejos en diferentes bloques experimentales.

ANEXO 1. GENERACIÓN DE RATONES “KNOCKOUT”

Los ratones “knockout” son generados a partir de dos procesos. Primero se producen células portadoras de una mutación en un gen específico, lo cuál es conocido como mutación dirigida o inactivación de un gen. Posteriormente se produce un ratón portador de una mutación dirigida, mediante la integración de las células portadoras de dicha mutación.

A continuación se describen estos procesos:

(1) Producción de células portadoras de una mutación en un gen específico (mutación dirigida o inactivación de un gen). Primero, se utiliza un gen clonado, en el que se ha generado una delección, para producir células totipotenciales embrionarias (SE, del inglés “*embryonic stem cells*”) portadoras de la delección génica.

(a) Se altera *in vitro* el gen clonado para dar lugar al vector que generará la mutación. La figura 1 muestra un ejemplo. En este caso se representa un gen que ha sido inactivado por la inserción del gen *neo* (neomicina) en la región informativa de un gen. Posteriormente, el gen *neo* servirá como marcador indicativo de que el DNA del vector se ha integrado en un cromosoma. Además, el vector contiene un segundo marcador en un extremo: el gen *tk* del herpes. Estos marcadores son los habituales, pero podrían utilizarse otros.

(b) El vector completo con ambos marcadores se introduce en células aisladas de un embrión de ratón.

(c) Si se produce recombinación homóloga, el gen original es sustituido por el DNA vector, incluyendo el gen interrumpido pero excluyendo el marcador del extremo. En muchas células, sin embargo, el vector completo (incluyendo el marcador *tk* se integra aleatoriamente en un cromosoma o ni siquiera se integra.

(d) Para aislar las células donde el vector se ha integrado por recombinación homóloga, todas las células se depositan en un medio con G418 (un análogo de la neomicina) y ganciclovir. El compuesto G418 es letal para las células que

no hayan incorporado un gen neo funcional, y de este modo, elimina aquellas células en las que el vector no se ha integrado. Por otro lado, el ganciclovir es tóxico para las células portadoras del gen tk y sirve para eliminar aquellas células donde el vector se ha integrado aleatoriamente. Por consiguiente, las únicas células que sobrevivirán y proliferarán son aquellas en las que el vector se ha integrado homológamente (Capecchi, 1994; Griffiths y cols., 2000).

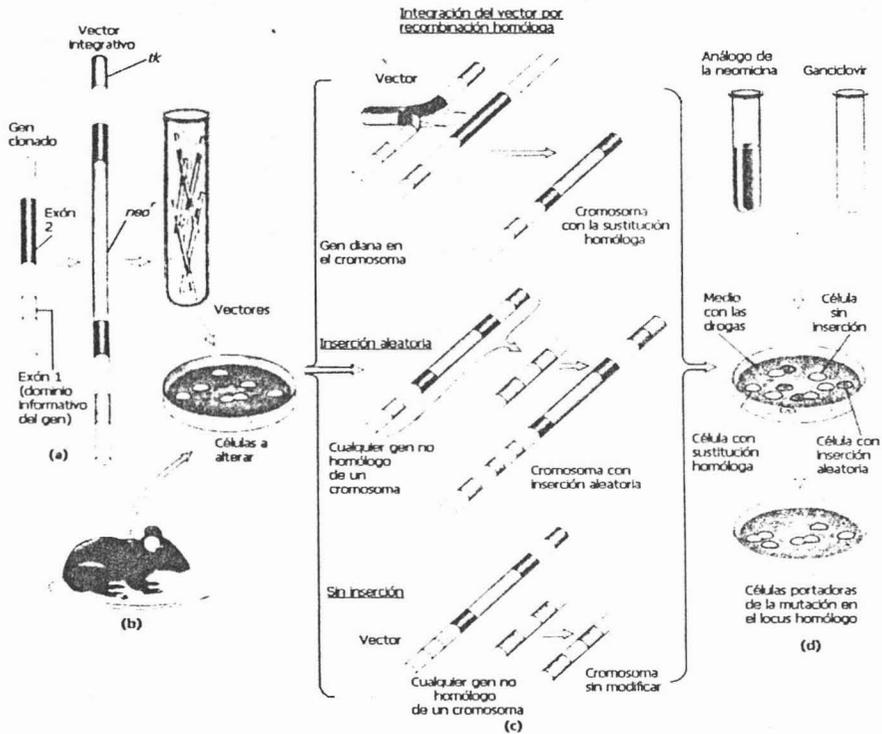


FIGURA 1.- ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE CÉLULAS PORTADORAS DE UNA MUTACIÓN EN UN GEN ESPECÍFICO. TOMADA DE GRIFFITHS Y COLS., 2000.

(2) Producción de un ratón portador de una mutación dirigida. En segundo lugar, las células embrionarias portadoras de una copia del gen inactivado se inyectan en un embrión en etapas tempranas. La descendencia resultante es quimérica, pues contiene tejidos derivados tanto de las células receptoras

como de las líneas de células totipotenciales trasplantadas. Finalmente, se cruzan entre sí, ratones quiméricos para producir ratones homocigóticos portadores de una copia interrumpida del gen en cada cromosoma.

(a) Se aíslan células totipotenciales embrionarias (ES) a partir de un ratón marrón y se introduce una mutación dirigida en uno de sus cromosomas. Las células ES alteradas se introducen en embriones en etapas tempranas. El color del pelaje de los recién nacidos sirve para determinar si las células ES han sobrevivido en el embrión, ya que se introducen en embriones que producirían pelaje completamente negro que carece del alelo dominante agutí. Los embriones portadores de las células ES completan su desarrollo en madres adoptivas. En los recién nacidos con parches de coloración agutí entremezclados con parches negros, las células ES han sobrevivido y proliferado (estos ratones se denominan quimeras debido a que están constituidos por células procedentes de dos estirpes diferentes de ratón). Una coloración negra uniforme, por el contrario, sugeriría que las células ES no han sobrevivido, por lo que este tipo de ratones quedaría excluido. En la figura 2, podemos observar la representación de este proceso. Donde *A* representa agutí, *a* representa negro; *m* es la mutación dirigida y *M* el alelo silvestre. (b) Machos quiméricos se cruzan con hembras negras (no agutí). Se analiza la descendencia para detectar la presencia de la mutación en el gen de interés. El examen directo de los genes en los ratones agutí revela cuáles de estos animales han heredado la mutación. Los ratones homocigóticos para la mutación y, por tanto, carentes de un gen funcional, se obtienen mediante cruzamiento de machos y hembras portadores. Este tipo de animales se identifican de forma definitiva por análisis directo de su ADN. Lo que podemos observar en la figura 2 es la ejemplificación de forma clara a través de características fenotípicas de las modificaciones genéticas obtenidas en los ratones (Capecchi, 1994; Griffiths y cols., 2000).

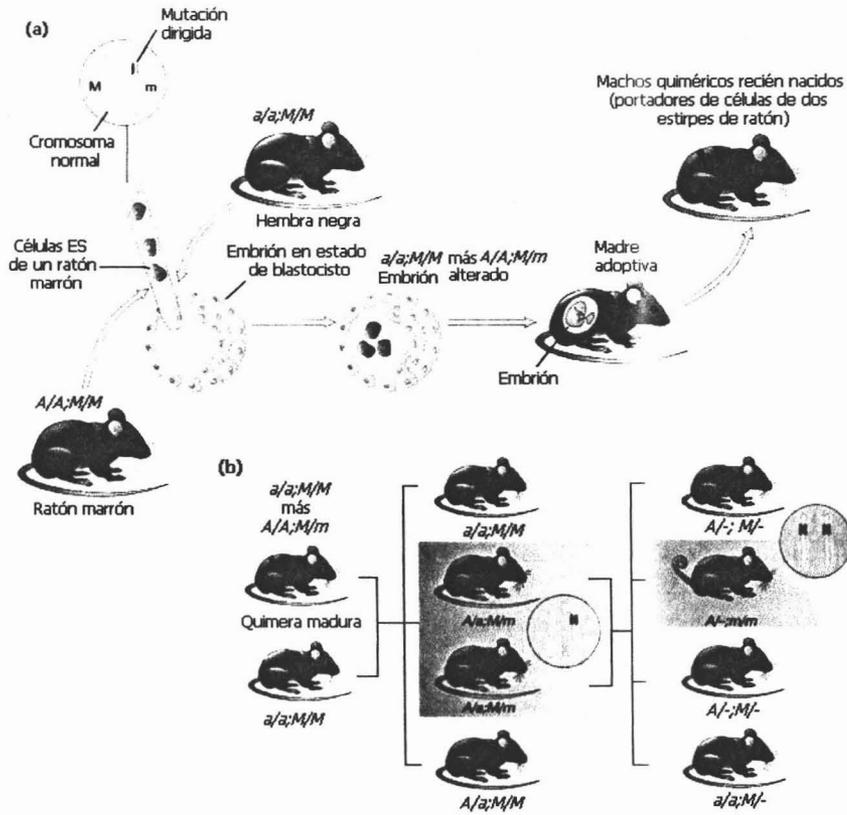


FIGURA 2.- ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE UN RATÓN PORTADOR DE UNA MUTACIÓN DIRIGIDA. TOMADA DE GRIFFITHS Y COLS., 2000.

ANEXO 2: OTROS SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DE LA ANSIEDAD

1) SISTEMA GABAÉRGICO

Las vías GABAérgicas ejercen una influencia inhibitoria sobre la liberación de muchos neurotransmisores conocidos como mediadores de acciones ansiogénicas. Su principal influencia supresora está dada (tanto en los cuerpos celulares como a nivel de las terminales nerviosas) sobre las proyecciones corticolímbicas noradrenérgicas y serotoninérgicas, cuya sobre-actividad puede inducir estados de ansiedad (Millan, 2003). Aunado a lo anterior, se ha visto que el "miedo condicionado" está acompañado por una activación de las interneuronas GABAérgicas en agrupaciones celulares, tanto noradrenérgicas en el locus coeruleus como serotoninérgicas en los núcleos del rafé, de acuerdo con la noción de que su actividad está sujeta a un "freno" GABAérgico bajo condiciones de estrés (Wang y cols., 1992; Gobert y cols., 2000; Millan y cols., 2000; Somogyi y Llewellyn-Smith, 2001; Ishida y cols., 2002).

Algunas neuronas GABAérgicas son inhibitoras de la liberación –por efecto del estrés– de dopamina (DA), glutamato, colecistocinina, del factor liberador de corticotropina (CRF) y de algunos otros mediadores ansiogénicos (Owens y cols., 1989, 1991; Karreman y Moghaddam, 1996; Keim y Shekhar, 1996; Beaufour y cols., 2001; Miklós y Kovacz, 2002). En general, el control de los estados de ansiedad por mecanismos GABAérgicos se puede enumerar como sigue: (1) por la modulación de la transmisión monoaminérgica, (2) por las interacciones con receptores monoaminérgicos post-sinápticos para proyecciones monoaminérgicas y (3) por acciones independientes de las vías monoaminérgicas (Millan, 2003).

Hay algunas evidencias de que existe una perturbación en la transmisión GABAérgica en pacientes con desórdenes de ansiedad (Goddard y cols., 2001, 2002). Por ejemplo, hay estudios neuroquímicos que indican que la irrupción de la transmisión GABAérgica puede disparar la ansiedad (Martijena y cols., 2002; Stork y cols., 2000, 2003). Así, ratones deficientes de la glutamato Descarboxilasa, la principal enzima participante en la síntesis de GABA (Millan,

2002), muestran un aumento en los niveles de ansiedad (Kash y cols., 1999; Stork y cols., 2000 y 2003). Por otra parte, a través de la prueba de conflicto de Vogel y de otros modelos de conflicto han sido demostradas acciones ansiolíticas de drogas que interfieren con la recaptura neuronal de GABA o inhibitoras de la GABA transaminasa –enzima limitante de la transformación de GABA en glutamato, como el vigabatrin (Ágmo y cols., 1991; Gadea y López- Colomé, 2001; Schmitt y cols., 2002; Millan, 2002). Además, recientemente, a través de una batería de pruebas clínicas, se encontró que este inhibidor de la degradación de GABA es eficiente en el tratamiento de desórdenes de pánico (Zwanzger y cols., 2001).

Muchos agentes farmacológicos, que actúan a través de su unión con los receptores GABA_A, (incluidas las benzodiazepinas) han sido empleados en el tratamiento de los desórdenes de ansiedad. Las benzodiazepinas son usadas como ansiolíticos, tranquilizantes y relajantes musculares, entre otros. Sin embargo, tienen efectos como disturbios en la coordinación motora y en el sueño durante el día. Adicionalmente, las benzodiazepinas tienen efectos subjetivos y reforzadores que pueden contribuir a su abuso. Estudios recientes revelan la existencia de múltiples subtipos del receptor GABA_A e investigaciones con ratones transgénicos postulan que la diversidad de los efectos conductuales de las drogas benzodiazepínicas puede reflejar acciones en los diferentes subtipos de receptores GABA_A. Así mismo, los hallazgos en ratones pueden trasladarse a otras especies, especialmente primates, aunque no es bien sabido. Sin embargo, virtualmente no hay información que permita evaluar el papel de los diferentes subtipos del receptor GABA_A en las propiedades adictivas de las benzodiazepinas en ninguna especie (Rowlett y cols., 2004). Las benzodiazepinas son pentámeros con tipos proteínicos distintos (α , β y γ), la principal de estas relacionada con las acciones ansiolíticas es la subunidad α .

2) SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Las proyecciones dopaminérgicas están ampliamente involucradas en los mecanismos de motivación y recompensa, sin embargo, algunas evidencias también sugieren su participación en la exploración de estímulos novedosos

no aversivos (Hooks y Kalivas, 1995; Volkow y cols., 2002; Wightman y Robinson, 2002). Por ejemplo, se observa que los agentes reforzadores dopaminérgicos pueden influir sobre los estados de ansiedad utilizando paradigmas de ansiedad que integran la exploración de ambientes no familiares y otras medidas de neofobia (Homberg y cols., 2002; Marinelli y Piazza, 2002). Inicialmente, se ha propuesto que los efectos emocionales positivos asociados con la activación de las vías dopaminérgicas mesolímbicas pueden disminuir el impacto negativo del estrés (Marinelli y Piazza, 2002). En este mismo sentido, hay pruebas que indican que bajo condiciones de estrés se aumenta la auto-administración de drogas de abuso dopaminérgicas (Piazza y cols., 1990; Homberg y cols., 2002). Otra muestra intrínseca de la interrelación entre la ansiedad, la respuesta y la dopamina está dada por el fenómeno de auto-acicalamiento como respuesta al estrés. Esta conducta (la cual involucra las redes dopaminérgicas mesolímbicas) puede servir como un proceso que contribuye a la restauración de la homeostasis después de estrés (Spruijt y cols., 1992; Bandler y cols., 2000; Homberg y cols., 2002). Por otra parte, se han investigado las acciones de los ligandos dopaminérgicos sobre la ansiedad a través del uso de modelos animales. De este modo se ha encontrado que las vías dopaminérgicas tienen un importante papel en el desarrollo de esta patología a través de la formación, retención y extinción de asociaciones de miedo y memoria (Morrow y cols., 1999; Arnsten y cols., 2000; Greba y cols., 2001; Pezze y cols., 2001; Nieullon, 2002).

3) SISTEMA NORADRENÉRGICO

El sistema noradrenérgico está constituido por proyecciones que van desde el *locus coeruleus* e inervan fuertemente el hipocampo, la amígdala, la materia gris periacueductal, la corteza, el hipotálamo y esencialmente todas las regiones corticolímbicas envueltas en la integración de la respuesta a la ansiedad (Lindvall y Björklund, 1984; Aston-Jones y cols., 1991; Valentino y Aston-Jones, 1995; Schatzberg y Schildkraut, 1995; Tanaka y cols., 2000). Existe una activación marcada y sostenida de las vías noradrenérgicas en el locus coeruleus por ansiógenicos y otros estímulos estresantes (Bremner y cols., 1996; McQuade y cols., 1999; Sans y cols., 2000; Frenstra y cols., 2001;

Ishida y McIntyre y cols., 2002). Esta activación se acompaña de manifestaciones emocionales, cognitivas y autonómicas de miedo (Tanaka y cols., 2000; Pardon y cols., 2002; Schulz y cols., 2002; Shekhar y cols., 2002) y puede ser de particular importancia en la inducción de ataques de pánico (Udhe y cols., 1984; Gorman y cols., 1989, 2000; Coupland y cols., 1996; Sullivan y cols., 1999; Shekhar y cols., 2002). De acuerdo con lo anterior, se ha identificado una aceleración en la liberación de noradrenalina en respuesta al miedo y otros estresores en algunas regiones corticolímbicas, incluyendo la corteza frontal, la amígdala y el hipocampo, (Aston-Jones y cols., 1991; Sigewald y Charp, 2000; Lapid y cols., 2001). Además, es esencial considerar el papel de las diferentes clases de los receptores adrenérgicos α_1 , α_2 y β - en la modulación de los estados de ansiedad (Bylund y cols., 1994; Hieble y cols., 1995; Hieble, 2000; Piascik y Perez, 2001; Audinot y cols., 2002). La activación de los receptores α_1 en la amígdala se ha implicado en la inducción de la ansiedad provocada por estrés (Cecchi y cols., 2002) y se han observado acciones ansiogénicas de agonistas α_1 administrados centralmente (Berridge y Dunn, 1989; Yang y cols., 1990; Carrasco y Van de Kar, 2003). Se ha propuesto que la activación de los receptores adrenérgicos α_1 aumenta las propiedades ansiolíticas de las benzodiazepinas en paradigmas de ansiedad que implican conflicto (Söderpalm y Engel, 1988, 1990; Söderpalm, 1995).

Por otra parte, se ha observado que algunos efectos de agonistas y agonistas parciales de los receptores α_2 parecen tener acciones ansiolíticas en procedimientos conductuales que no implican un entrenamiento. Sin embargo, en general, las acciones ansiolíticas de los receptores α_2 se ejercen sobre un rango de dosis confinado. Mientras que el antagonista α_2 , yohimbina, ha mostrado aumentar los niveles de ansiedad en humanos, estrictamente en sujetos ansiosos, opiodes-dependientes y susceptibles de sufrir ataques de pánico. Además, algunos investigadores han documentado las propiedades ansiogénicas de la yohimbina en modelos de conflicto. Sin embargo muchos estudios reportan acciones ansiolíticas.

Dada su distribución anatómica, los receptores β -adrenérgicos, participan en la regulación de los estados de ansiedad. Existe una alta concentración de los

receptores β_1 y 2 en la corteza, la amígdala, el hipocampo, la sustancia gris periacueductal y otras regiones límbicas implicadas en el control de los estados de ansiedad (Schatzberg y Schildkraut, 1995; Nicholas y cols., 1996). Los receptores β -adrenérgicos localizados en la amígdala, el hipocampo y la corteza frontal modulan emociones y cognición (Pralong y cols., 2002; Wang y cols., 2002). Además, los receptores β_1 y 2 facilitan la liberación y la síntesis de noradrenalina y probablemente de la serotonina en la corteza frontal y en algunas estructuras subcorticales (Gobert y Millan, 1999; Tsuiji y cols., 2000). Estos receptores participan en la regulación del eje hipotálamo-corticotrópico cuando es activado como respuesta al estrés (Carrasco y Van de Kar, 2003).

Algunos reportes indican que agonistas parciales de los receptores β -adrenérgicos tienen acciones ansiolíticas en modelos conductuales como el conflicto de Vogel, cuya actividad se propone, es mediada por la co-participación de otros receptores, tal como el 5-HT_{1A} (Przegalinski y cols., 1994, 1995). Mientras que antagonistas de los receptores β -adrenérgicos son usados en el tratamiento de los ataques de pánico (Tyrrer, 1992).

REFERENCIAS

Adell, A., Casanovas, J.M., Artigas F., 1997. Comparative study in the rat of actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology* 36, 735-741.

Agmo, A., Pruneda, R., Guzman, M., Gutiérrez, 1991. GABAergic drugs and conflict behavior in the rat: lack of similarities with the actions of benzodiazepines. *Neuropsychopharmacology Arch. Pharmacol.* 334, 314-322.

Ahmad G, Zamenhof S., 1978. Serotonin as a growth factor for chick embryo brain. *Life Sci.* 22(11), 963-70.

Amat, J., Matus-Amat, P., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1998. Escapable and inescapable stress differentially alter extracellular levels of 5-HT in the basolateral amygdala of the rat. *Brain Res.* 812, 113-120.

Arnsten, A.F.T., Murphy, B., Merchant, K., 2000. The selective dopamine D₄ receptor antagonist, PNU-101387G, prevents stress-induced cognitive deficits in monkeys. *Neuropharmacology* 23, 405-410.

Aston-Jones, G., Shipley, M.T., Chouvet, G., Ennis, M., Van Bockstaele, E., Peribone, V., Shiekhhattar, R., Akaoka, H., Drolet, G., Astier, B., Charléty, P., Valentino, R.J., Williams, J.T., 1991. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res.* 88, 47-86.

Audinot, V., Fabry, N., Nicolas, J.P., Beauverger, Neuman-Trancredi, A., Millan, M.J., Try, A., Bornancin, F., Canet, E., Boutin, J.A., 2002. Ligand modulation of [³⁵S]GTPγS binding at human α_{2A}, α_{2B} and α_{2C} adrenoceptors. *Cell Signal.* 14(10):829-837.

Azmitia, E. C. y Segal, M., 1978. An autoradiographic analysis of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641-64-59.

Baez, M., Kursar, J.D., Helton, L.A., Wainscott, D.B., Nelson, D.L., 1995. Molecular biology of serotonin receptors. *Obes Res.* 3 (4), 441S-447S.

Bandler, R., Keay, K.A., Floyd, N., Price, J., 2000. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res. Bull.* 53, 95-104.

Beaufour, C.C., Le Bihan, C., Hamon, M., Thiebot, M.H., 2001. Extracellular serotonin is enhanced in the striatum, but not in the dorsal hippocampus or prefrontal cortex, in rats subjected to an operant conflict procedure. *Behav. Neurosci.* 115(1):125-137.

Barrett, J.E., 1992. Studies on the effects of 5-HT_{1A} drugs in the pigeon. *Drug Dev. Res.* 26, 299-317.

Barton, C.L., Jay, M.T., Meurer, L., Hutson, P.H., 1999. GR205171, a selective NK1 receptor antagonist, attenuates stress-induced increase of dopamine metabolism in rat medial prefrontal cortex. *Br. J. Pharmacol.* 126, 284P.

Baumgarten, H.G., Grozdanovik, Z., 1997. Anatomy of central serotonergic projection systems. *Handbook Exp. Pharmacol.* 129. 41-89.

Beaufour, C.C., Le Bihan, C., Hamon, M., Thiébot, M.-H., 2001. Extracellular serotonin is enhanced in the striatum, but not in the dorsal hippocampus or prefrontal cortex, in rats subjected to an operant conflict procedure. *Behav. Neurosci.* 115, 125-137.

Beglopoulos, V., Shen, J., 2004. Gene-targeting technologies for the study of neurological disorders. *Neuromolecular Med.* 6(1):13-30.

Belzung, C., Griebel, G., 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav. Brain Res.* 125, 141-149.

Berridge, C.W., Dunn, A.J., 1989. Restraint-stress-induced changes in exploratory behavior appear to be mediated by norepinephrine-stimulated release of CRF. *J Neurosci.* 9(10):3513-21.

Berton, O., Aguerre, S., Sarrieau, A., Normede, P., Chauloff, F., 1998. Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 82, 147-159.

Blanchard, D.C., Griebel, G., Blanchard, R.J., 2003. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assay for anxiety and panic. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 97-116.

Bourin, M., Hascoët, M., 2002. Drug mechanisms in anxiety. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2 (2):259-65. (Rev.)

Bouwknegt, J.A., Hijzen, T.H., van der Gugten, J., Maes, R.A., Hen, R., Olivier B., 2001. Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biol. Psychiatry.* 49(7):557-68.

Bourin, M., Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 55-65.

Bremner, J.D., Krystal, J.H., Southwick, S.M., Charney, D.S., 1996. Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety. I. Preclinical studies. *Synapse* 23, 28-38.

Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.-P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R., Trendelenburg, U., 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 121-134.

Capecchi, M.R., 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science*. 244(4910):1288-1292.

Capecchi, M.R., 1994. Targeted gene replacement. *Sci Am*. 270(3), 52-59.

Carrasco G.A., Van de Kar, L.D., 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur. J. Pharmacol*. 463(1-3), 235-72.

Cecchi, M., Khoshbouei, H., Morilak, D.A., 2002. Modulatory effects of norepinephrine, acting on alpha 1 receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. *Neuropharmacology*. 43(7):1139-47.

Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillazo, G., Artigas, F., 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci*. 21(24), 9917-9929.

Charrier, D., Dangoumau, L., Hamon, M., Puech, A.J., Thiebot, M.H., 1994. Effects of 5-HT1A receptor ligands on a safety signal withdrawal procedure of conflict in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994 May;48(1):281-289.

Chaouloff, F., 1995. Regulation of 5-HT receptors by corticosteroids: where do we stand? *Fundam. Clin. Pharmacol*. 9(3), 219-33.

Chubakov, A.R., Gromova, E.A., Knovalov, G.V., Chumasov, E.I., Sarkisova, E.F., 1985. Effect of serotonin on the development of tissue cultures of the cerebral cortex in the rat. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 35(5), 926-34.

Condren RM, Dinan TG, Thakore JH., 2002. A preliminary study of buspirone stimulated prolactin release in generalised social phobia: evidence for enhanced serotonergic responsivity? *Eur Neuropsychopharmacol*. 12(4):349-54.

Conn, P.J., 2003. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Nov;1003:12-21 (Rev).

Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Onaivi, E.S., 1989. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 33(1):197-203.

Coupland, N., Malizia, A., Bailey, J., Nutt, D., 1996. Thyrotropin-releasing hormone: a potential comparator for the panicogenic effects of pentagastrin and CCK? *Biol. Psychiatry*. 39(6):465-466.

Crabbe, J.C., Phillips, T.J., Feller, D.J., Hen, R., Wwnger, C.D., Lessov, C.N., Schafer, G.L., 1996. Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT1B serotonin receptors. *Nat. Genet*. 1996 14(1), 98-101.

Crawley, J., Goodwin, F.K., 1980 . Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13(2), 167-70.

D'Amato, R. J., M. E. Blue, B. L.Largent, D. R. Lynch, D. J. Ledbetter, M.E. Molliver y S. H. Snyder, 1987. Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4322-4326.

Dalley JW, Theobald DE, Pereira EA, Li PM, Robbins TW., 2002. Specific abnormalities in serotonin release in the prefrontal cortex of isolation-reared rats measured during behavioural performance of a task assessing visuospatial attention and impulsivity. *Psychopharmacology.* 164(3):329-340.

Daval, G., Verge, D., Becerril, A., Golzan, H., Spampinato, U. y Hamon, M., 1987. Transient expression of 5-HT_{1A} receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 5, 171-180.

Deakin, J.F., 1988. 5HT₂ receptors, depression and anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29(4):819-20.

Deakin, J.F.W., Graeff, F.G., 1991. 5-HT and mechanisms of defence. *J. Psychopharmacol.* 5, 305-315.

De Boer S.F., Slangen, J.L., van der Gugten, J., 1990. Effects of chlordiazepoxide and buspirone on plasma catecholamine and corticosterone levels in rats under basal and stress conditions. *Endocrinol Exp.* 1990 Mar;24(1-2):229-39.

De Boer, S. F., Kölas, J.M., 2003. Defensive burying rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 463: 145-161.

De Felipe, J., Hendry, S.H., Hashikawa, T., Jones, E.G., 199. Synaptic relationships of serotonin-immunoreactive terminal baskets on GABA neurons in the cat auditory cortex. *Cereb. Cortex.* 1(2):117-133.

De Vry, J., 1995. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology.* 21(1):1-26.

De Vry, J., Benz, U., Schreiber, R., Traber, J., 1993. Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *Eur. J. Pharmacol.* 249(3):331-339.

Dyck, R.H., Cynader, M.S., 1993. Autoradiographic localization of serotonin receptor subtypes in cat visual cortex: transient regional, laminar, and columnar distributions during postnatal development. *Journal Neurosci.* 13(10), 4316-38.

Eison, A.S., Eison, M.S., 1994. Serotonergic mechanisms in anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 18(1):47-62.

El-Khodor, B.F., Dimmler, M.H., Amara, D.A., Hofer, M., Hen, R., Brunner, D., 2004. Juvenile 5HT(1B) receptor knockout mice exhibit reduced pharmacological sensitivity to 5HT(1A) receptor activation. *Int. J. Dev. Neurosci*. 22 (5-6), 405-413.

Eveden, J.L., 1999. The pharmacology of impulsive behaviour in rats VII: the effects of serotonergic agonists and antagonists on responding under a discrimination task using unreliable visual stimuli. *Psychopharmacology*. 146(4):422-31.

Feenstra MG, Vogel M, Botterblom MH, Joosten RN, de Bruin JP. 2001. Dopamine and noradrenaline efflux in the rat prefrontal cortex after classical aversive conditioning to an auditory cue. *Eur J Neurosci*. 13(5):1051-4.

Fernstrom JD, Wurtman, R.J., 1971. Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science*. 173(992):149-52

File, S.E., Andrews, N., Wu P.Y., Zharkovsky, A., Zangrossi Jr., H., 1992. Modification of chlordiazepoxide's behavioral effects of acute and neurochemical effects by handling and plus-maze experience. *Eur. J. Pharmacol*. 218, 9-14.

File, S.E., Seth, P., 2003. A review of 25 years of the social interaction test. *Eur. J. Pharmacol*. 463(1-3):35-53.

Fletcher, A., Foster, E.A., Bill, D.J., Brown, G. Cliffe, I.A., Hartley, J.R., Jones, D.E., McLenachan, A., Stanhope, K.J., Critchley, D.J., Childs, K.J., Middlefell, V.C., Lanfumey, L., Corradetti, R., Laporte, A.M., Gozlan, H., Hamon, M., Dourish, C.T., 1996. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behavi. Brain Res*. 73, 337-353.

Gadea A., López-Colomé, A.M., 2001. Glial transporters for glutamate, glycine. *J. Neurosci. Res*. 63, 461-468.

Gaddum, J.H., Picarelli, Z.P., 1957. Two kinds of tryptamine receptor. 1957. *Br J Pharmacol*. 1997 Feb;120(4 Suppl):134-9; 132-3.

Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Korner H. Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods*. 181(1):1-15. Rev..

Gobert, A., Millan, M.J., 1999. Modulation of dialysate levels of dopamine, noradrenaline, and serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely-moving rats by (-) pindolol alone and association with 5-HT reuptake inhibitors: comparative roles of β -adrenergic, 5-HT_{1A}, and 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 268-284.

Goddard A.W., Mason, G.F., Almai, A., Rothman, D.L., Behar, K.L., Petroff, A.C., Charney, D.S., Krystal, J.H., 2001. Reductions in occipital cortex GABA levels in panic disorder detected with ^3H -magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 556-561.

Golden, R.N., Gilmore, J., 1990. Serotonin and mood disorder. *Psychiatr. Ann.* 20, 580-586.

Gorman, J.M., Liebowitz, M.R., Fyer, A.J., Stein, J., 1989. A neuroanatomical hypothesis for panic disorder. *Am. J. Psychiatry* 146: 148-161.

Gorman, J.M., Kent, J.M., Sullivan, G.M., Coplan, J.D., 2000. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder. *Am. J. Psychiatry* 157: 493-505.

Gorzalka, B.B., Mendelson, S.D., Watson, N.V., 1990. Serotonin receptor subtypes and sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 600:435-44.

Grailhe, R., Waeber, C., Dulawa, S.C., Hornung, J.P., Zhuang, X., Brunner, D., Geyer, M.A., Hen, R., 1999. Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT_{5A} receptor. *Neuron* 22: 581-591.

Greba, Q., Giffkins, A., Kokkinidis, L., 2001. Inhibition of amygdaloid dopamine D₂ receptors impairs emotional learning measured with fear-potentiated startle. *Brain Res.* 899, 218-226.

Green, A.R., McGregor, I.S., 2002. On the anxiogenic and anxiolytic nature of long-term cerebral 5-HT depletion following MDMA. *Psychopharmacology* 162, 448-450.

Griebel, G., 1995. 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther.* 65(3):319-395.

Griffiths, A. J., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C., 2000, in Capitulo 11, Aplicaciones de la técnica del DNA recombinante. *Genética Moderna.* 358-361.

Gross C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Osting, R. Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R., 2002. Serotonin _{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416, 396-400.

Handley, S.L., 1995. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol. Ther.* 66, 103-148.

Handley S.L., McBlane J.W., 1993. An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 29(3):129-38.

Handley, S.L., McBlane, J.W., Critchley, M.A., Njung'e, K., 1993. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional

and cognitive factors.
Behav Brain Res. 58(1-2):203-210.

Harro, J., 2002. Long-term partial 5-HT depletion: interference of anxiety and impulsivity? *Psychopharmacology* 164, 433-434.

Häskoet, M., Bourin, M., Khimake, S., 1994. Additive effect of lithium and clonidine with 5-HT_{1A} agonists in the forced swimming test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 18(2):381-396.

Hieble, J.P., Ruffolo, R.R., 1995. Possible structural and functional relationships between imidazoline receptors and alpha 2-adrenoceptors. *Ann N Y Acad Sci.* 763:8-21.

Hieble, J.P., 2000. Adrenoreceptor subclasification: an approach to improved cardiovascular therapeutics. *Pharm. Acta Helv.* 74: 163-171.

Heisler, L.K. Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., ParsonS, L. H. y Tecott, L. H. 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15049-15054.

Hillion, J., Milne-Edwards, J. B., Catelon, J., de Vitry, F., Gros, F. y Hamon, M. 1993. Prenatal developmental expression of rat brain 5-HT_{1A} receptor gene follows by PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 991-997.

Holmes, A., Hollon, T.R., Gleason, T.c., Liu, Z., Dreiling, J., Sibley, D.R., 2001. Behavioral characterization of dopamine D₅ receptor null mutant mice. *Behav. Neurosci.* 115: 1129-1144.

Homberg, J.R., van den Akker, M., Raaso, H.S., Wardeh, G., Binnekade, R., Schoffelmeer, A.N., de Vries, T.J., 2002. Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci.* 15(9):1542-1550.

Hooks, M.S., Kalivas, P.W., 1995. The role of mesoaccumbens--pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. *Neuroscience.* 64(3):587-597.

Hoyer, D., Clarke, D. E., Forzard, J. R., Hartg, P. R. y Humphrey, P. P.1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46, 157-203.

Imaizumi, M., Suzuki, T., Machida, H., Onodera, K., 1994. A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 14(2):83-91.

Ishida, Y., Hashiguchi, H., Takeda, R., Ishizuka, Y., Mitsuyama, Y., Kannan, H., Nishimori, T., Nakahara, D., 2002. Conditioned-fear stress increases Fos

expression in monoaminergic and GABAergic neurons of the locus coeruleus and dorsal raphe nuclei. *Synapse* 45: 46-51.

Jacobs BL, Azmitia EC. 1992. Structure and function of the brain serotonin system.

Physiol Rev. 72(1):165-229. Rev.

Jorgensen, H., Knigge, U., Kjaer, A., Vadscholt, T., Warberg, J., 1998.

Serotonergic involvement in stress-induced ACTH release. *Brain Res.* 811:10-20.

Jorgensen, H., Kjaer, A., Warber, J., Knigge, U., 2001. Differential effect of serotonin 5-HT_{1A} receptor antagonists on the secretion and prolactin.

Neuroendocrinology 73: 322-333.

Karreman, M., Moghaddam, B., 1996. Effect of a pharmacological stressor on glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Brain Res.* 716(1-2):180-182.

Kash, S.F., Tecott, L.H., Hodge, C., Baekkeskov, S., 1999. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1698-1703.

Keim, S.R., Shekhar, A., 1996. The effects of GABA_A receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats. *Brain Res.* 739:46-51.

Kendler, K. S., Neale, M. C., Kessler, R. C., Heath, A. C. y Eaves, L. J. 1992.

Childhood parental loss and adult psychopathology in women: A twin study perspective. *Arch. Gen. Psychiat.* 49, 109-116

King, C.M.F., Gommans, J., Joordens, R.J.E., Hijzen, T.H., Maes, R.A.A., Oliver, B., 1997. Effects of 5-HT_{1A} receptor ligando in a modified S  ller-Seifter conflict model in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 325:121-128.

Kirby, L.G., Pernar, L., Valentino, R.J., Beck, S.G., 2003. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116:669-683.

Kosofsky, B.E. y M. E. Molliver, 1987. The serotonin and norepinephrine innervation of primary visual cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1:153-168.

Kojima, T., Homma, S., Sako, H., Shimizu, I., Okada, A. y Okado, N. 1988. Developmental changes in density and distribution of serotonergic fibers in the chick spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 267, 580-589.

Laaris, N., Le Poul, E., Laporte, A.M., Hamon, M., Lanfumey, L., 1999. Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience.* 91(3):947-958.

Lambe, E.K., Goldman-Rakic, P.S., Aghajanian, G.K., 2000. Serotonin induces EPSCs preferentially in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex in the rat. *Cereb Cortex.* 10(10):974-980.

Lapiz, M. D., Fulford, A., Muchimapura, S., Manson, R. Parker, T. y Marsden, C. A. 2001. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditions behavior and neurotransmission. *Ross Fiziol Im I M Sechenova* 87, 730-751.

Lauder, J.M., Towle, A.C., Patrick, K., Henderson, P., Krebs, H., 1985. Decreased serotonin content of embryonic raphe neurons following maternal administration of p-chlorophenylalanine: a quantitative immunocytochemical study. *Brain Res.* 352(1):107-14.

Lidov, H. G. y M. E. Molliver, 1982. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull* 8:389-430.

López-Rubalcava, C., Cruz, S.L., Fernández-Guasti, A., 1999. Blockade of the anxiolytic-like action of ipsapirone and buspirone, but not that of 8-OH-DPAT, by adrenalectomy in male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 24(4):409-422

López-Rubalcava, C., Hen, R., Cruz, S.L., 2000. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT_{1B} knockout and wild-type mice. *Behav. Brain Res.* 115, 85-94.

López-Rubalcava, C., 1996. Pre- or Postsynaptic Activity of 5-HT_{1A} Compounds in Mice Depends on the Anxiety Paradigm. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 54 (4), 677-686.

Lovenberg, T.W., Erlander, M.G., Baron, B.M., Sutcliffe, J.G., 1993 Cloning of new 5-HT receptors. *Int Clin Psychopharmacol.* 8 Suppl 2:19-23.

Marinelli, M., Piazza, P.V., 2002. Interaction between glucocorticoid hormone, stress and psychostimulant drugs. *Eur. J. Neurosci.* 16, 387-394.

Martijena, I.D., Rodríguez Manzanares, P.A., Lacerra, C., Molina, V.A., 2002. Gabaergic modulation of the stress response in frontal cortex and amygdale. *Synapse* 45, 86-94.

Martinez, G., Ropero, C., Funes, A., Flores, E., Blotta, C., Landa, A.I., Gargiulo, P.A., 2002. Effects of selective NMDA and non-NMDA blockade in the nucleus accumbens on the plus-maze test. *Physiol. Behav.* 79, 219-224.

Matsuo, M., Kataoka, Y., Mataka, S., Kato, Y., Oi, K., 1996. Conflict situation increases serotonin release in rat dorsal hippocampus: in vivo study with microdialysis and Vogel test. *Neurosci. Lett.* 215, 197-200.

Mazer, C., Muneyyirci, J., Taheny, K., Rajo, N., Borella, A., Whitaker-Azmitia, P., 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased

synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Res.* 760(1-2):68-73.

McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., McEwen, B.S., Sakai, R.R., 1995. Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol. Psychiatry* 37, 383-393.

McQuade, R., Creton, D., Stanford, S.C., 1999. Effect of novel environmental stimuli on rat behaviour and central noradrenaline function measured by in vivo microdialysis. *Psychopharmacology* 145, 393-400.

McQuade, R., Sharp, T., 1997. Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J. Neurochem.* 69, 791-796.

Meneses, A., 1999. 5-HT system and cognition. *Neurosci. Behav. Rev.* 23, 1111-1125.

Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355-474.

Miklós, I.H., Kovacs, K.J., 2002. GABAergic innervation of corticotrophin-releasing hormone (CRH)-secreting parvocellular neurons and its plasticity as demonstrated by quantitative immunoelectron microscopy. *Neuroscience* 113, 581-592.

Millan, M.J., 2003. The neurobiology and control of anxious status. *Prog. Neurobiol.* 70, 83-244.

Millan, M.J., Maiofiss, L., Cussac, D., Audinot, V., Boutin, J.A., Newman-Tancredi, A., 2000. Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 791-804.

Miura, H., Qiao, H., Ohta, T., 2002. Influence of ageing and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse* 46, 116-124.

Möller, C., Sommer, W., Thorsell, A., Rimondini, R., Heilig, M., 2002. Anxiogenic-like action of centrally administered glucagon-like peptide-1 in a punished drinking test. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26:119-122.

Moret, C., Briley, M., 2000. The possible role of 5-HT_{1B/D} receptors in psychiatric disorders and their potential as a target of therapy. *Eur. J. Pharmacol.* 404, 1-12.

- Morrow, B.A., Elsworth, J.D., Rasmusson, A.M., Roth, R.H., 1999. The role of mesoprefrontal dopamine neurons in the acquisition and expression of conditioned fear in the rat. *Neuroscience* 92, 553-564.
- Navarro, J.F., Maldonado, E., 2002. Acute and subchronic effects of NMDA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26, 1151-1154.
- Nazar, M., Siemiatkowski, M., Czlonkowska, A., Sienkiwiez-Jarosz, H., Plaznik, A., 1999. The role of hippocampus and 5-HT/GABA interaction in the central effects of benzodiazepine receptor ligands. *J. Neural Transm.* 106, 369-381.
- Netto, M.S., Silveira, R., Cysne Còimbra, N., Joca, S.R.L., Silveira Guimaraes, F., 2002. Anxiogenic effect of median raphe nucleus lesion in stressed rats. *Prog. Neuropharmacol. Biol. Psychiatry* 26, 1135-1141.
- Nicholas, A.P., Hökfelt, T., Pieribone, V.A., 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol. Sci.* 18:210-211.
- Njung'e, K., Handley, S.L., 1991. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 38(1):63-67.
- Oleskewich, S., Lacaille, J.C., 1992. Reduction of GABAB inhibitory postsynaptic potentials by serotonin via pre- and postsynaptic mechanisms in CA3 pyramidal cells of rat hippocampus in vitro. *Synapse.* 12(3):173-188.
- Owens, M.J., Bissette, G., Nemeroff, C.B., 1989. Acute stress of alprazolam and adinazolam on the concentrations of corticotropin-releasing factor in the rat brain. *Synapse* 4: 196-202.
- Owens, M.J., Vargas, A., Knight, D.L., Nemeroff, C.B., 1991. The effects of alprazolam on corticotropin-releasing factor neurons in the rat brain: acute time course, chronic treatment and abrupt withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258:349-356.
- Pardon, M.C., Gould, G.G., Garcia, A., Phillips, L., Cook, M.C., Miller, S.A., Mason, P.A., Morilak, D.A., 2002. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. *Neuroscience.* 115(1):229-42.
- Pezze, M.A., Heidbreder, C.A., Feldon, J., Murphy, C.A., 2001. Selective responding of nucleus accumbens core and shell dopamine to aversively conditioned contextual and discrete stimuli. *Neuroscience* 108: 91-102.
- Piascik, M.T., Perez, D.M., 2001. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298(2):403-10.

- Piazza, P.V., Deminière, J.M., Le Moal, M., Simos, H., 1990. Stress- and pharmacologically-induced behavioural sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res.* 514:22-26.
- Picazo O, Lopez-Rubalcava C, Fernandez-Guasti A., 1995. Anxiolytic effect of the 5-HT_{1A} compounds 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin and ipsapirone in the social interaction paradigm: evidence of a presynaptic action. *Brain Res Bull.* 37(2):169-75.
- Plaznik, A., Jessa, M., Bidzinski, A., Nazar, M., 1994. The effect of serotonin depletion and intra-hippocampal midazolam on rat behavior in the Vogel Conflict Test. *Eur. J. Pharmacol.* 257:293-296.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M., Mengod, G., 1992. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J. Neurosci.* 12(2):440-453.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3):3-33.
- Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D., Hen, R., 1998. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci.* 95(24):14476-14481.
- Ramboz, S., Saudou, F., Amara, D.A., Belzung, C., Segu, L., Misslin, R., Buhot, M.C., Hen, R., 1996. 5-HT_{1B} receptor knock out – behavioral consequences. *B. Brain Res.* 73, 305-312.
- Remmers, J.E., 1990. Sleeping and breathing. *Chest.* 97(3 Suppl):77S-80S.
- Rodríguez-Manzo, G., López-Rubalcava, C., Hen, R., Fernández-Guasti, A., 2002. Participation of 5-HT_{1B} receptors in the inhibitory actions of serotonin on masculine sexual behavior of mice: pharmacological analysis in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *British Journal of Pharmacology* 136, 1127-1134.
- Rosenzweig, E.S., Redish, A.D., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., 2003. Hippocampal map realignment and spatial learning. *Nat Neurosci.* 6(6):609-615.
- Rubenstein, J.L., 1998. Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol Psychiatry.* 44(3):145-150.
- Sanders-Bush, E., Bushing, J.A., Sulser, F., 1972. Long-term effects of p-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid in brain. *Eur J Pharmacol.* 20(3):385-388.

Sanders-Bush, E., Gallager, D.A., Sulser, F., 1974. On the mechanism of brain 5-hydroxytryptamine depletion by p-chloroamphetamine and related drugs and the specificity of their action. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 10:185-194.

Sanger, G.J., 1985. Three different ways in which 5-hydroxytryptamine can affect cholinergic activity in guinea-pig isolated ileum. *J Pharm Pharmacol.* 37(8):584-6

Scearce-Levie, K., Chen, J.P., Gardner, E., Hen, R., 1999. 5-HT receptor knockout mice: pharmacological tools or models of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 868:701-715.

Scheel-Kruger, J., Petersen, E.N., 1982. Anticonflict effect of the benzodiazepines mediated by a GABAergic mechanism in the amygdala. *Eur J Pharmacol.* 82(1-2):115-6.

Schreiber, R., de Vry, J., 1993. Neuroanatomical basis for the antidepressant-like effects of the 5-HT(1A) receptor agonists 8-OH-DPAT and ipsapirone in the rat forced swimming test. *Behav Pharmacol.* 4(6):625-636.

Shekhar, A., Katner, J.S., Sajdyk, T.J., Kohl, R.R. 2002. Role of norepinephrine in the dorsomedial hypothalamic panic response: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(3):493-500

Shephard, R.A., 1986. Neurotransmitters, anxiety and benzodiazepines: a behavioral review. *Neurosci Biobehav Rev.* 10(4):449-61.

Shephard, R.A., 1987. Behavioral effects of GABA agonists in relation to anxiety and benzodiazepine action. *Life Sci.* 40(25):2429-2436.

Stanhope, K.J., Dourish, C.T., 1996. Effects of 5-HT1A receptor agonists, partial agonists and a silent antagonist on the performance of the conditioned emotional response test in the rat. *Psychopharmacology.* 128(3):293-303.

Söderpalm, B., Anseron, G., Enerback, C., Engel, J.A., 1997. In vivo administration of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT interferes with brain GABA(A)/benzodiazepine receptor complexes. *Neuropharmacology.* 36(8):1071-1077.

Sodhi, M.S. y Sanders-Bush, E., 2004. Serotonin and Brain Development. *Int. Rev. Neurobiol.* 59, 111-174.

Somogyi, J., Llewellyn-Smith, I.J., 2001. Patterns of colocalization of GABA, glutamate and glycine immunoreactivities in terminals that synapse on dendrites of noradrenergic neurons in rat locus coeruleus. *Eur J Neurosci.* 14(2):219-28.

Treit, D., 1990. A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacol Biochem Behav.* 36(1):203-205.

Turlejski, K., 1996. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiol Exp.* 56(2):619-636.

Twarog, B. M. y I. H. Page, 1953. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.* 175:157-161.

Vertes, R.P., Fortin, W.J., Crane, A.M., 1999. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 407(4):555-582.

Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Goldstein, R.Z., 2002. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem.* 78(3):610-24.

Vu, D.H., Tork, I., 1992. Differential development of the dual serotonergic fiber system in the cerebral cortex of the cat. *J Comp Neurol.* 317(2):156-174.

Whitaker-Azmitia, P.M., 2001. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.* 56 (5), 479-485.

Zwanzger, P., Baghai, T., Boerner, R.J., Moller, H.J., Rupprecht, R., 2001. Anxiolytic effects of vigabatrin in panic disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 21(5):539-40.