

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ESTUDIOS EN TORNO AL COMPORTAMIENTO ESTRUCTURAL Y
CINÉTICO DEL RECEPTOR GABA_A EN RELACIÓN A LA
MODULACIÓN AMIGDALINA DE LA ANSIEDAD.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA LA LICENCIADA EN BIOLOGÍA
CANDY PATRICIA FLORES GRACIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA

COMITÉ TUTORAL: DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVÁN
DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Sede Sur, por el apoyo otorgado para la elaboración de esta tesis.

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección del Dr. Miguel Pérez de la Mora, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (Proyectos: IN200508; IN203111) y con el apoyo de la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Sede Sur.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
TRABAJOS PUBLICADOS	7
MARCO TEÓRICO	8
ANSIEDAD	8
EL SUSTRATO ANATÓMICO DE LA ANSIEDAD	10
LA AMÍGDALA	11
LA QUÍMICA DE LA ANSIEDAD	15
Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	15
Glutamato.....	16
Sistemas peptidérgicos	17
Sistemas monoaminérgicos	17
Moduladores hormonales.....	19
LOS RECEPTORES GABAÉRGICOS	20
Propiedades farmacológicas y funcionales de los receptores GABA _A y GABA _A rho.....	20
Composición de subunidades.....	24
Estructura oligomérica y función	26
FENÓMENO DE TOLERANCIA AL PRIMER ENSAYO (“ONE-TRIAL TOLERANCE”)	30
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34
METAS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
MATERIALES	35
MÉTODOS	35
Cirugía y Microinyección.....	35
Laberinto elevado en forma de “+”	36
Prueba de Campo Abierto.....	37
Niveles de corticosterona en el plasma.....	37
Evaluación histológica.....	38
Validación de los efectos ansiolíticos del midazolam en el laberinto elevado en forma de “+”.....	38
Evaluación cinética de los efectos ansiolíticos del midazolam en ratas no tratadas farmacológicamente pero expuestas al laberinto elevado en forma de “+”.....	39
Autorradiografía para los receptores GABA/benzodiazepinas.....	39
Análisis estadísticos.....	40

RESULTADOS.....	42
Efecto de la manipulación farmacológica de receptores GABAérgicos con diferente composición de subunidades sobre la modulación amigdalina de la ansiedad.	42
Efecto de la inhibición de los receptores GABAA rho amigdalinos sobre la conducta de la rata en el laberinto elevado en forma de "+".	42
Campo abierto.....	45
Niveles de corticosterona en el plasma.....	46
Análisis temporal del fenómeno de la tolerancia al primer ensayo.	47
Efectos del midazolam en animales con una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de "+".	48
Cinética de la unión del [³ H]flunitrazepam a los receptores GABA/benzodiazepinas en rebanadas de amígdala provenientes de animales sometidos en ausencia de fármacos al laberinto elevado en forma de "+"	49
DISCUSIÓN	54
Papel de receptores GABA _A rho en la modulación amigdalina de la ansiedad.	55
Comportamiento cinético del receptor GABA _A ante estímulos ansiogénicos.....	60
CONCLUSIÓN	64
LITERATURA CITADA.....	65
ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS.....	85
Figuras.....	85
Cuadros	86

RESUMEN

Los receptores GABA_A son estructuras oligoméricas cuya estructura cuaternaria en los receptores convencionales está determinada por la agregación de subunidades alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) y épsilon (ϵ); y en los receptores GABA_A rho (ρ) recientemente descubiertos, por la asociación exclusiva de subunidades rho y eventualmente γ . Adicionalmente, la evidencia que se ha acumulado proveniente de diversas fuentes ha señalado que los receptores GABA_A convencionales tienen un papel preponderante en la modulación amigdalina de la ansiedad y que sus propiedades dependen en gran medida de su estructura cuaternaria.

El presente trabajo pretende, mediante el estudio de los efectos diferenciales que resultan del bloqueo de los receptores GABA_A convencionales y GABA_A rho, obtener evidencia del papel que juegan los cambios de la estructura cuaternaria de los receptores GABA_A en la modulación amigdalina de la ansiedad. Adicionalmente se pretende estudiar la posible aparición de cambios cinéticos adaptativos en los receptores GABA_A convencionales como consecuencia de la exposición de los roedores ante situaciones ansiogénicas específicas, como podría ser una sola exposición al laberinto elevado en forma de "+".

Los resultados obtenidos mostraron que la administración bilateral intra-amigdalina (6-240 pmol/lado) del ácido(1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il)metilfosfínico (TPMPA), un antagonista selectivo del receptor GABA_A rho, disminuye de manera dosis dependiente la exploración en los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de "+", sin afectar la locomoción y aumentando los niveles de corticosterona en plasma. En contraste, la bicuculina (1.8-60 pmol/lado) no tuvo efectos en la exploración del laberinto y en las dosis mayores produjo convulsiones. Asimismo se encontró que la sola exposición de los roedores al laberinto es capaz de inducir dentro del núcleo basolateral de la amígdala, cambios cinéticos adaptativos en los receptores GABA_A convencionales que afectan su afinidad (K_D) pero no el número de receptores (B_{max}), y que son responsables de una disminución de la unión de las benzodiazepinas a sus sitios de unión dentro de este receptor y a la pérdida consecutiva de sus efectos ansiolíticos.

Los resultados de este trabajo apoyan el importante papel que juegan los receptores GABA_A en la modulación amigdalina de la ansiedad en los roedores. Mas aún, nuestros resultados indican que tanto el tipo de respuesta que muestran los roedores ante estímulos ansiogénicos específicos, como la adquisición por parte de ellos de propiedades funcionales y farmacológicas distintivas, depende en gran medida de la estructura cuaternaria de los receptores GABA_A y de los cambios cinéticos que de ella derivan.

ABSTRACT

GABA_A receptors are oligomeric molecules whose quaternary structure depends, on the case of conventional GABA_A receptors, on the aggregation of alpha (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) and epsilon (ϵ) subunits whereas in the newly discovered GABA_A rho (ρ) receptors upon the exclusive association of rho and eventually of rho and γ subunits. In addition, converging evidence indicates that GABA_A receptors have an important role in the amygdaloid modulation of anxiety and that their physiological properties are largely dependent on their quaternary structure.

The aim of this work is to ascertain by means the specific GABA_A or GABA_A rho receptor blockade the relevance of their quaternary structure on the amygdaloid modulation of anxiety. In addition, the possible induction of kinetic changes on conventional GABA_A receptors as a result of the exposure of rodents to anxiogenic conditions such as those experienced by these animals in the elevated plus "+" will be also studied.

The results of this work show that the bilateral intra-amygdaloid administration (6-240 pmol/side) of 1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl) methyl phosphinic acid (TPMPA), a selective GABA_A rho receptor antagonist to rats decreased in a dose-dependent fashion the open arm exploration in the elevated plus maze without affecting locomotion suggesting the induction of anxiogenic effects. In support to this, plasma corticosterone levels were also increased. In contrast with these findings, the bilateral intra-amygdaloid administration of bicuculline, a selective antagonist for conventional GABA_A receptors has no effects on the exploration of the maze but elicited seizures but in higher concentrations. In addition, it was found that the exposure of drug- free rodents to the elevated plus-maze was able to induce, within the amygdaloid basolateral nucleus, adaptive kinetic changes upon the benzodiazepine binding. It is suggested that these changes affecting affinity (K_D) but not number of receptors (B_{max}) may underlie the decrease observed in this work on the binding of benzodiazepine to conventional GABA_A receptors and the lose of their anxiolytic effects.

The results of this work support the role of GABA_A receptors in the amygdaloid modulation of anxiety and suggest that the response of rodents to specific anxiogenic stimuli as well as their subsequent acquisition of distinctive functional and pharmacological properties is dependent upon specific structural and kinetic changes affecting GABA_A receptor activity within the basolateral amygdaloid nucleus.

TRABAJOS PUBLICADOS

Flores-Gracia C, Nuche-Bricaire A, Crespo-Ramírez M, Miledi R, Fuxe K, Pérez de la Mora M. (2010) GABA(A) rho receptor mechanisms in the rat amygdala and its role in the modulation of fear and anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 212(4):475-484.

Pérez de la Mora M, Jacobsen KX, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C, Fuxe K. (2008) Wiring and volume transmission in rat amygdala: Implications for fear and anxiety. *Neurochemical Research*. 33(8):1618-33.

Pérez de la Mora M, Hernández-Gómez AM, Arizmendi-García Y, Jacobsen KX, Lara-García D, Flores-Gracia C, Crespo-Ramírez M, Gallegos-Cari A, Nuche-Bricaire A, Fuxe K. (2007) Role of the amygdaloid cholecystokinin (CCK)/gastrin-2 receptors and terminal networks in the modulation of anxiety in the rat. Effects of CCK-4 and CCK-8S on anxiety-like behaviour and [³H]GABA release. *European Journal of Neuroscience*. 26(12):3614-3630.

Pérez de la Mora M, Flores-Gracia C, Crespo Ramírez M, Hernández Gómez AM, Lara García D. (2006) La amígdala: una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad. En: *Investigación en neurociencias*", Dr. Alfredo Fera Velasco, Serie: Homenaje a Científicos Mexicanos. 2006 Ed. Ruth De Celis. Bios-Medica Editores. México. Pp 165-179.

Pérez de la Mora M, Lara-García D, Jacobsen KX, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C, Escamilla-Marvan E, Fuxe K. (2006) Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. *European Journal of Neuroscience*. 23(10):2749-59.

MARCO TEÓRICO

ANSIEDAD

La ansiedad es una respuesta adaptativa que prepara a un individuo a detectar y contender en contra de un peligro real o potencial. Dicha respuesta cumple una función vinculada con la supervivencia de las especies ya que, sin esta respuesta, la vida de un organismo estaría continuamente en entre dicho.

Bajo condiciones de ansiedad normales, un individuo experimenta una sensación de inquietud y aprehensión que lo alerta sobre la existencia de algo que para su especie constituye una amenaza. Dicho estado se acompaña de un estado de hipervigilancia, que le permite explorar su entorno para buscar y caracterizar aquello que pueda dañarlo. Aunado a esto, se presentan una serie de síntomas somáticos, tales como el aumento de la tensión muscular y los reflejos, así como de numerosos síntomas autonómicos entre los que destacan las palpitaciones, la sudoración, la falta de aliento, el aumento de la presión arterial y el aumento de la frecuencia respiratoria. Todos estos síntomas somáticos preparan al individuo para afrontar la situación u objeto que lo amenaza.

Generalmente, una vez que la situación de emergencia ha concluido, el individuo se tranquiliza y todos estos síntomas desaparecen al regularizar sus constantes fisiológicas. Cuando la ansiedad se torna patológica, todos o algunos de estos síntomas aparecen sin causa alguna y se hacen más ostensibles de lo que la supuesta amenaza exige haciendo que, en el caso de los humanos, se experimente un estado de terror inexplicable, acompañado frecuentemente de la sensación de muerte inminente, de irrealidad, de pérdida de control, de síntomas de evitación, o de diversos tipos de obsesiones y compulsiones.

Por otro lado, cuando los niveles de ansiedad son tan bajos que no permiten que el individuo reaccione ante estímulos peligrosos, se genera otro tipo de trastorno. Tal es el caso de individuos con el síndrome de Klüver-Bucy ([Klüver y Bucy, 1937](#)), donde una lesión de la amígdala en monos genera una disminución en los síntomas de ansiedad, haciendo que los animales lesionados se acerquen a toda clase de objetos, inanimados o no, sin desconfianza, examinándolos con la boca en lugar de las manos, sin importar que estos objetos sean peligrosos. Dichos animales dejan de mostrar respuestas emocionales, motoras o vocales, típicamente asociadas a estímulos que en monos intactos provocan miedo o enojo ([Davis y Whalen, 2001](#)). A pesar de lo sugestivo de su sintomatología, el

síndrome de Klüver-Bucy aún no está bien definido, pues en trabajos más recientes en donde se han utilizado métodos de lesión que no afectan las fibras nerviosas que pasan por la amígdala rumbo a su destino final, no se ha reproducido completamente la disminución tan marcada de la ansiedad que se describió inicialmente (Kling et al, 1993).

La ansiedad como trastorno psiquiátrico es un problema que afecta a un número significativo de la población general. Su prevalencia durante la vida de un sujeto considerando cualquiera de sus trastornos es de alrededor de 25% (Heinze, 2003), mientras que la prevalencia en 1 año está estimada entre el 13.1% y el 17.1% (Silverstone, 2004). No hay duda entonces, que debido a esto, la ansiedad patológica debe ser considerada como un fuerte problema de salud pública.

Adicionalmente, es necesario señalar que algunas enfermedades consideradas psicósomáticas, como las úlceras pépticas, son con frecuencia causadas por respuestas fisiológicas repetidas o continuas que acompañan al estrés o a la ansiedad. Un mecanismo similar podría estar operando en otros desórdenes tales como ataques cardíacos, apoplejías, asma, dismenorreas y jaquecas que, aunque pueden ocurrir cuando no se experimenta ansiedad frecuente, ésta los agrava notablemente (Carlson, 1996).

EL SUSTRATO ANATÓMICO DE LA ANSIEDAD.

La ansiedad requiere de una serie de regiones cerebrales que participan en su integración y expresión. Numerosas estructuras anatómicas interconectadas entre sí, dentro de lo que se ha denominado el sistema límbico, han sido implicadas en los mecanismos que modulan y soportan los estados ansiosos.

En 1878, Broca acuñó el término “límbico” para designar una serie de estructuras anatómicas conservadas filogenéticamente. Sin embargo, en 1937, James Papez fue el primer investigador en realizar un intento para establecer el sustrato anatómico de la ansiedad, al proponer que la emoción se genera en el hipocampo y es transmitida por el fórnix hasta los cuerpos mamilares, de donde pasa al núcleo anterior del tálamo y de ahí alcanza al giro cingulado que, según Papez, sería la región receptora de la emoción (Barili et al, 1998).

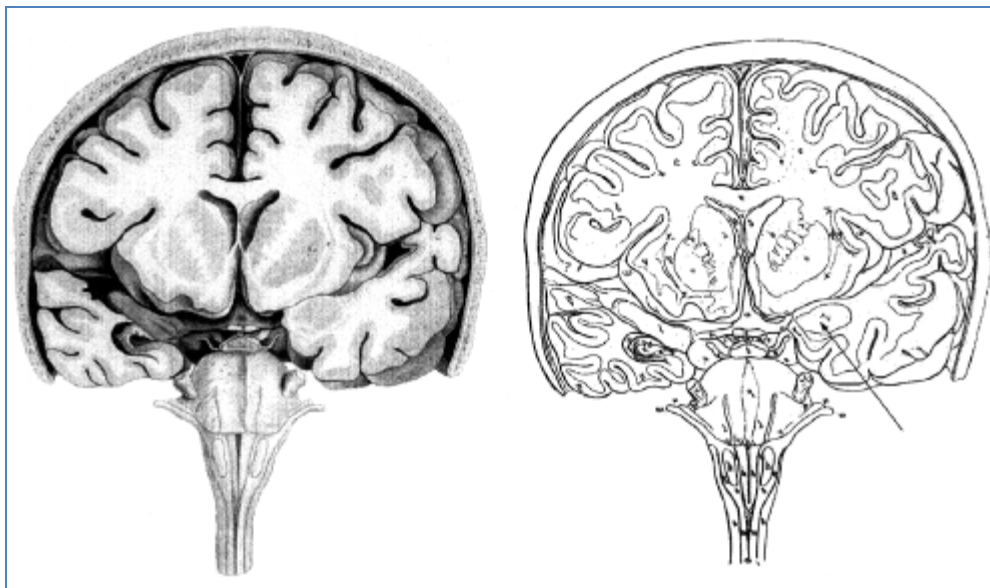
La definición del sistema límbico maduró con el trabajo de MacLean quien en 1949 incluyó a la amígdala dentro de este sistema anatómico, y elaboró una red neuronal que involucraba a la corteza frontal y otros núcleos subcorticales en la modulación de la emoción, como el septum y el núcleo accumbens (Pralong et al, 2002). El papel del septum en la ansiedad fue destacado posteriormente por Gray y McNaughton quienes lo incorporaron como parte fundamental a un “sistema de inhibición conductual” denominado “septo-hipocampal” que, de acuerdo con ellos, operaría durante la ansiedad y estaría modulado por la corteza cerebral (Gray y McNaughton, 2002). Por otro lado, dado que el núcleo paraventricular del hipotálamo participa en la integración de las respuestas adrenocorticales del estrés (Yadin et al, 1993; Carrasco y Van der Kar, 2003) ,y el núcleo supramamilar está relacionado con el control cognoscitivo de las emociones (Kirk, 1998; Pan y McNaughton, 2002), ambas estructuras han sido incluidas dentro del sistema límbico.

Adicionalmente, estudios recientes han sugerido que otras estructuras tales como la sustancia gris periacueductal, el hipotálamo medial y el colículo inferior pudieran estar involucradas en la modulación de entradas aversivas y en la coordinación de la conducta defensiva y ansiosa. En apoyo de lo anterior, ha sido encontrado que el colículo inferior genera a través de sus proyecciones con la amígdala, respuestas condicionadas y no condicionadas a estímulos auditivos (Maisonnette et al, 2000; Macedo et al, 2002). Por último, se ha visto que prácticamente todas las regiones corticales tiene un papel importante en la respuesta al miedo y al estrés (Pratt, 1992; Pralong et al, 2002).

LA AMÍGDALA

Dentro de estas estructuras, la amígdala juega un papel de primera magnitud en la vida emocional de un sujeto, pues su participación en el miedo y la ansiedad es por todos reconocido. En 1819 el anatomista Karl Burdach describió una masa de células en forma de almendra localizada en las profundidades de la corteza temporal de los humanos, a la que llamó amígdala (Figura 1).

Figura 1: Primera ilustración del “núcleo amigdalino” en el hemisferio cerebral humano



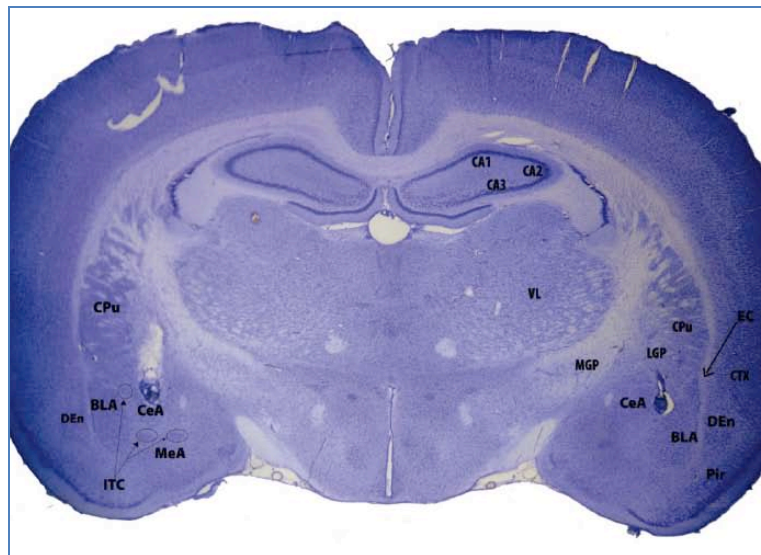
La flecha indica el núcleo amigdalino como lo describió Burdach, quien sólo se refirió al complejo basolateral de la amígdala. Trabajos posteriores añadieron la corteza olfatoria adyacente y el núcleo central y medial de la amígdala, formando el complejo amigdalino, el cual ha sido extendido recientemente incluyendo el núcleo cama de la estría terminal y partes de la sustancia innominata.

Tomado de Swanson y Petrovich (1998)

Medio siglo después de la descripción de Burdach, Theodor Meynert sostuvo que la amígdala era la extensión ventral del claustrum del lóbulo temporal y no fue sino hasta el año de 1923 cuando J.B. Johnston describió ampliamente a la amígdala e introdujo una nomenclatura que ha servido de base para todas las nomenclaturas actuales. Johnston propuso que la amígdala está dividida en un grupo primitivo de núcleos asociados al sistema olfatorio, que incluye a los núcleos central, medial, cortical y el del tracto olfatorio lateral, así como de un grupo filogenéticamente nuevo de núcleos formado por el núcleo lateral y el núcleo basal de la amígdala (Swanson y Petrovich, 1998).

Ahora sabemos que la amígdala es una región heterogénea formada por varias partes (Figura 2). Una de ellas representa la expansión ventromedial del cuerpo estriado e incluye al núcleo central, al núcleo medial y al área anterior; otra parte, formada por el núcleo del tracto olfatorio lateral, los núcleos corticales y las áreas amigdalinas piriformes y postpiriformes, constituye la corteza olfatoria caudal y por último, la tercera de ellas considerada como la extensión ventromedial del claustrum, está formada esencialmente por el núcleo lateral, el núcleo basal y el núcleo posterior de la amígdala (Swanson y Petrovich, 1998).

Figura 2: Núcleos de la amígdala en el cerebro de la rata



Sección coronal representativa a nivel de -2.30 mm del bregma. CPU: putamen caudado, BLA: núcleo basolateral, CeA: núcleo central, MeA: núcleo medial, DEn: núcleo endopiriforme dorsal, ITC: islas intercaladas, VL: núcleo talámico ventromedial, MGP: globo pálido medial, LGP: globo pálido lateral, CTX: corteza, CPU: caudoputamen, Pir: corteza piriforme.

Tomado de Nuche-Bricaire (2008)

Cabe señalar que por su papel en la modulación de la ansiedad destacan el llamado complejo basolateral, que es la principal estación de entrada de la amígdala y que agrupa a los núcleos lateral, basolateral, basomedial y accesorio basal, así como el núcleo central que constituye su principal estación de salida (Pérez de la Mora et al, 2010). Es notorio asimismo, una colección de masas celulares densamente pobladas (islas intercaladas paracapsulares) que se interponen entre el complejo basolateral y el núcleo central de la amígdala y que se considera constituyen una interface inhibitoria que controla el tráfico de impulsos entre ambos núcleos (Milhouse, 1986).

Estudios de lesión y/o estimulación eléctrica de la amígdala han demostrado el importante papel de esta estructura en la modulación de la ansiedad (Cuadro 1).

Cuadro 1	
Efectos de la lesión y estimulación eléctrica de la amígdala	
Kluver y Bucy, 1937	Daño del lóbulo temporal causa disturbios emocionales.
Kaada, 1951	Estimulación eléctrica de la amígdala provoca respuestas de ansiedad en humanos y animales.
Chapman et al, 1954 Gloor et al, 1981	La estimulación eléctrica de la amígdala genera sentimientos de miedo o ansiedad, así como reacciones autonómicas indicativas de miedo.
Weiskrantz, 1956 Zola-Morgan et al, 1991	Lesión restringida de la amígdala produce varios de los efectos de síndrome de Klüver-Bucy, incluidos la pérdida de miedo y el enojo, incrementa la exploración del ambiente e hiper-oralidad.
Ursin, 1960	Produce un reflejo de extrema atención en gatos, respuesta asociada con el miedo y la ansiedad.
Goddard, 1964 Adolphs et al, 1998 Aggleton, 1993	Lesión de la amígdala asociada con déficit emocional, incluida la pérdida de reconocimiento de miedo.
Blanchard y Blanchard, 1972 Vazdarjanova et al, 2001	Lesión en la amígdala provoca la reducción de congelamiento en ratas expuestas a un gato sedado y a pelos de gato.
Applegate et al, 1983	Produce un reflejo de extrema atención en conejos, respuesta asociada con el miedo y la ansiedad.
Feldman y Weidenfeld, 1998	La estimulación de la amígdala causa un incremento en los niveles de corticosterona en el plasma.
McGaugh et al, 1996 Pape y Driesang, 1998	La activación de la amígdala tiene un efecto modulador en la adquisición y consolidación de memoria que evoca una respuesta emocional.
Bechara et al, 1995 La Bar et al, 1995	Lesión de la amígdala perturba el condicionamiento al miedo en primates no humanos y humanos.
Likhtik et al, 2008	La lesión de las islas paracapsulares mediales interfiere con la extinción de respuestas condicionadas.

Así, la lesión de la amígdala está relacionada con la disminución del miedo y la ansiedad, y los síntomas emocionales del síndrome de Klüver-Bucy pueden ser reproducidos removiendo la amígdala pero no el hipocampo y las partes corticales que lo rodean ([Zola-Morgan et al, 1991](#)).

Cómo ya se mencionó anteriormente, la amígdala juega un papel importante en la modulación del miedo y la ansiedad ([Davis y Whalen, 2001](#); [Everitt et al, 2003](#); [Engin y Treit, 2008](#); [LeDoux, 2000](#); [Millan, 2003](#)). Estímulos relevantes emocionalmente, que vienen del tálamo y la corteza, llegan al complejo basolateral de la amígdala y, después de ser

procesados, son transmitidos al núcleo central amigdalino donde se implementa una respuesta ansiogénica apropiada.

Estudios realizados por Everitt y sus colaboradores (2003) han mostrado, sin embargo, que además de estos caminos seriales para procesar los estímulos ansiogénicos, se puede llevar a cabo un procesamiento paralelo de la información que involucra entradas y salidas independientes, desde y hacia el núcleo basolateral y el núcleo central.

Finalmente, cabe señalar que considerable evidencia experimental sugiere que la neurotransmisión intra-amigdalina está controlada merced a la existencia de varias interfases inhibitorias de naturaleza GABAérgica. De acuerdo con esto se ha descrito una interfase que controlaría el tráfico de los impulsos nerviosos que vienen del núcleo basolateral al núcleo central medial (Collins y Paré, 1999; Royer et al, 1999; Royer et al, 2000) y supuestas interfases GABAérgicas adicionales que modularían la información que envía la corteza cerebral al núcleo basolateral (Marowsky et al, 2005) o al núcleo central medial (Quirk et al, 2003; Sun et al, 1994). Para una discusión más amplia sobre el funcionamiento de estas interfases GABAérgicas inhibitorias ver Pérez de la Mora et al, 2008.

LA QUÍMICA DE LA ANSIEDAD

La ansiedad es una respuesta compleja que incluye componentes físicos y emocionales. Desde el punto de vista bioquímico la mayoría de los neurotransmisores parecen estar involucrados en la ansiedad. Sin embargo, parecería que la ansiedad se mantiene en equilibrio gracias esencialmente a la actividad de dos sistemas de neurotransmisión: el sistema glutamatérgico y el sistema GABAérgico. Estos sistemas ejercen acciones ansiogénicas y ansiolíticas respectivamente, en varios niveles de los circuitos neuronales. Sin embargo, las catecolaminas (como la dopamina o la noradrenalina) o indolaminas (como la serotonina), que tienen a la amígdala como blanco de muchas de sus acciones, ejercen un papel modulador complejo sobre estos sistemas neuronales y por ende sobre la ansiedad. Así mismo, se ha encontrado que una constelación de neuropéptidos también participan en la ansiedad, entre los que se encuentran la colecistoquinina (CCK), la somatostatina, el neuropéptido "Y", el péptido intestinal vasoactivo o los péptidos opioides, y el más recientemente descrito neuropeptido S.

En la amígdala se han encontrado prácticamente todos los neurotransmisores descritos, pero el papel de sólo unos cuantos en la modulación de la ansiedad ha sido estudiado con cierto detalle (Millan, 2003; Engin y Treit, 2008). Por otro lado, también se ha documentado los efectos de algunos compuestos que ejercen acciones moduladoras en la amígdala (Millan, 2003; Engin y Treit, 2008).

Ácido γ -aminobutírico (GABA)

En la amígdala, por medio del uso de anticuerpos en contra de la enzima descarboxilasa glutámica que sintetiza al GABA y que por tal razón es un marcador selectivo para las neuronas GABAérgicas, se pudo demostrar en 1981 la presencia de abundantes terminales GABAérgicas inmunoreactivas, esparcidas entre los cuerpos celulares de neuronas localizadas en la mayor parte de los núcleos amigdalinos de la rata y en particular en la parte externa de la corteza piriforme (Pérez de la Mora et al, 1981). Estudios posteriores basados en el uso de anticuerpos contra el GABA, mostraron que existen cuerpos celulares GABAérgicos en todos los núcleos de la amígdala, encontrándose la mayor densidad de ellos, en las islas intercaladas paracapsulares y en la porción lateral del núcleo central (Sun y Cassell, 1993; Fritschy y Mohler, 1995; Pirker et al, 2000). Más tarde, se demostró que las células GABAérgicas de las islas intercaladas reciben innervación glutamatérgica proveniente del complejo basolateral y proyectan sus

axones a neuronas GABAérgicas localizadas en los núcleos central y medial de la amígdala, así como a islas intercaladas paracapsulares situadas en posiciones más mediales (Royer et al, 2000).

Aunque en menor cantidad también se ha demostrado la presencia de neuronas GABAérgicas en el núcleo basolateral de la amígdala, habiéndose sugerido que estas neuronas funcionan como interneuronas locales. Así mismo, se ha observado que, aunque alrededor del 15% de estas neuronas son de naturaleza GABAérgica, el GABA coexiste con diversos neuropéptidos (McDonald y Pearson, 1989). Cabe señalar, que además de los sistemas GABAérgicos intrínsecos de la amígdala, se han descrito vías GABAérgicas amigdalinas de proyección como la que llega al núcleo del tracto solitario procedente del núcleo central (Saha, 2005), y que dentro de la amígdala, el núcleo basolateral contiene la mayor cantidad de receptores para benzodiazepinas (Niehoff y Kuhar, 1983; Thomas et al, 1985).

Glutamato

El sistema glutamatérgico está ampliamente representado en la amígdala, tanto en cuerpos celulares, como en numerosas terminales axónicas. La mayor parte de los cuerpos celulares en la amígdala presentan inmunoreactividad para las subunidades Glu-R1 y Glu-R2 del receptor AMPA, y para NMDAR1 del receptor NMDA en el núcleo basolateral (McDonald, 1994). En el núcleo lateral dichas subunidades se encuentran tanto en somas como en numerosas terminales inmunoreactivas para el glutamato, cuyo origen podría estar en neuronas del tálamo y de la corteza cerebral (LeDoux, 2000). También se ha demostrado la presencia de receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) dentro de la amígdala, como el receptor mGlu-R5 y mGlu-R2, los cuales pertenecen a los grupos I y II respectivamente. El receptor mGlu-R5 es preferentemente postsináptico y existe en pequeñas cantidades en la porción caudal de la amígdala, sobre las neuronas de las islas intercaladas paracapsulares mediales que separan el complejo basolateral del núcleo central (Pérez de la Mora et al, 2005). El receptor mGlu-R2, por el contrario, ha sido localizado presinápticamente en el neurópilo del núcleo basolateral de la amígdala de la rata (Mrzljak, 2003). Se han descrito también sistemas glutamatérgicos de proyección que llevan información desde el núcleo basolateral de la amígdala a la corteza prefrontal, al tálamo y al área tegmental ventral (Kocsis et al 2003; Takayama y Miura, 1992).

Sistemas peptidérgicos

Diversos estudios inmunohistoquímicos han evidenciado dentro de la amígdala la existencia de sistemas peptidérgicos locales y de otros que proyectan adicionalmente a núcleos extra-amigdalinos. Se han encontrado neuronas CCKérgicas en los núcleos basolateral, central, medial y cortical de la amígdala (Roberts *et al*, 1982; McDonald y Pearson, 1989). Casi el 100% de las interneuronas grandes y 50% de las pequeñas del núcleo basolateral de la amígdala, presentan inmunoreactividad para CCK en coexistencia con el GABA (McDonald y Pearson, 1989). En otras neuronas se ha podido determinar también dentro de este núcleo la coexistencia del GABA con el péptido intestinal vasoactivo (VIP). En el núcleo basolateral de la amígdala se localizaron numerosos receptores tipo CCK-B (Mercer *et al*, 2000), y en el núcleo central y medial abundantes fibras positivas para CCK en curso probablemente hacia blancos fuera de la amígdala (Roberts *et al*, 1982).

El péptido intestinal vasoactivo ha sido encontrado principalmente en los cuerpos celulares de neuronas del complejo basolateral (Roberts *et al*, 1982) en donde probablemente ejerzan sus acciones localmente (McDonald y Pearson, 1989) o inervando al núcleo central de la amígdala. Estas neuronas pueden coexistir dentro de la amígdala con el GABA (McDonald y Pearson, 1989) y con la CCK (Mascagni y McDonald, 2003).

Neuronas inmunoreactivas para el neuropéptido "Y" se han localizado en el núcleo medial y en la base de la estría terminal (Gustafson *et al*, 1986), así como del complejo basolateral, en donde un 90% de ellas coexisten con el GABA (McDonald y Pearson, 1989). También se han encontrado plexos densos de fibras que contienen al neuropéptido "Y" en el núcleo central y el núcleo medial de la amígdala (Gustafson *et al*, 1986), los cuales probablemente dan lugar a vías que llegarán a blancos tanto dentro, como fuera de la amígdala.

Sistemas monoaminérgicos

La amígdala tiene una inervación abundante de dopamina, noradrenalina y serotonina, que tienen su origen en cuerpos celulares localizados fuera de ella. En el área tegmental ventral (VTA) del mesencéfalo se encuentran las neuronas responsables de inervar dopaminérgicamente a la amígdala (Dahlström y Fuxe, 1964; Pérez de la Mora *et al*, 2010; Asan, 1998). Por otro lado, la inervación noradrenérgica y serotoninérgica de la

amígdala proviene de neuronas asentadas en el locus coeruleus, y el rafé dorsal y mediano respectivamente (Dahlström y Fuxe, 1964; Fallon y Ciofi, 1992; Ungerstedt, 1971).

El núcleo central de la amígdala es el mayormente inervado por las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. En este núcleo, los plexos dopaminérgicos y noradrenérgicos se superponen en la mayor parte de sus porciones, con la excepción de su porción central lateral en la que predomina la inervación dopaminérgica y la lateral capsular que apenas se encuentra inervada por ambos sistemas (Asan, 1998). Los núcleos basolateral y medial están también densamente inervados, aunque en menor proporción que el núcleo central.

De acuerdo a su topografía y localización, la densidad de las terminales dopaminérgicas varía a nivel de las islas intercaladas. En la porción rostralateral de la isla intercalada principal la densidad de las terminales dopaminérgicas es intensa en comparación con su porción rostromedial y caudal de la isla intercalada principal. Asimismo las islas intercaladas paracapsulares rostrales parecen estar más inervadas por terminales dopaminérgicas que las caudales (Fuxe et al, 2003). La inervación noradrenérgica de la isla intercalada principal y del resto de las islas intercaladas paracapsulares es escasa (Fuxe et al, 2003).

Por lo que toca a los receptores dopaminérgicos, los receptores D1 se encuentran localizados en las islas intercaladas paracapsulares y el núcleo basolateral a todos sus niveles (Scibilia et al, 1992; Fuxe et al, 2003), mientras que los receptores D2 parecen estar confinados al núcleo central de la amígdala (Scibilia et al, 1992; Pérez de la Mora et al, 2010; Pérez de la Mora et al, 2012).

La inervación serotoninérgica es particularmente densa en todo el complejo basolateral, la porción medial del núcleo central y el núcleo medial. Comparativamente, de menor importancia cuantitativa es la inervación serotoninérgica de la porción lateral del núcleo central y la del núcleo cortical posterior (Fallon y Ciofi, 1992). Como en el caso de las otras monoaminas, la transmisión serotoninérgica en la amígdala involucra la participación de numerosos tipos de receptores, entre los que destacan los 5HT1A y los 5HT3 que ejercen poderosos efectos sobre la ansiedad modulando la transmisión GABAérgica (Morales y Bloom, 1997; Sibille et al, 2000).

Moduladores hormonales

Además de los sistemas de neurotransmisión que interactúan dentro de la amígdala para modular la ansiedad, se encuentra la progesterona y el factor liberador de corticotropina. La primera posee notables acciones ansiolíticas (Fernández-Guasti y Picazo, 1992) que se supone son mediadas por su unión a sitios específicos localizados sobre los receptores GABA_A y que bien podrían tener a la amígdala como su sitio de acción. La inyección intra-amigdalina de progesterona tiene un efecto ansiolítico en ratas en algunos modelos animales de ansiedad (Frye y Walf, 2004) y los niveles de alopregnanolona, el metabolito activo de la progesterona, se encuentran elevados en la amígdala en ratas que fueron seleccionadas por “cruza” para mostrar niveles bajos de ansiedad tras ser separadas de sus madres (Zimmerberg et al, 2005).

La subunidad $\alpha 4$ del receptor GABA_A se encuentra sobre-expresada en condiciones de ansiedad elevada, y bajo condiciones de abstinencia a la progesterona existe un aumento selectivo en los niveles de esta subunidad en la amígdala y en el hipocampo (Gulinello et al, 2003), lo cual apoya la idea de que la activación de los receptores GABA_A en la amígdala podría ser la responsable de los efectos ansiolíticos de la progesterona.

Existen numerosas evidencias que señalan que el factor de liberación de la corticotropina tiene efectos ansiogénicos y que sus antagonistas pueden revertir las respuestas conductuales a muchos estresores (Koob y Heinrich, 1999). Este factor puede interactuar dentro de la amígdala con otros sistemas de neurotransmisores como el noradrenérgico y el glutamatérgico, ya que en el núcleo central de dicha estructura la noradrenalina estimula su liberación (Koob y Heinrich, 1999) y se ha reportado la presencia de receptores mGlu-R1 sobre neuronas inmunoreactivas para el factor de liberación de corticotropina (Smialowska et al, 2002). Además, un antagonista funcional para los receptores glutamatérgicos del tipo NMDA, el ácido 1-aminociclopropanecarboxílico (ACPC), desprovee de su inmunoreactividad para el factor de liberación de corticotropina a fibras y neuronas amigdalinas, indicando que el glutamato controla la síntesis o liberación de este factor vía receptores del tipo NMDA (Wieronska et al, 2001).

LOS RECEPTORES GABAÉRGICOS

Los receptores son componentes membranales proteicos de una célula que tienen la capacidad de identificar una sustancia, hormona o neurotransmisor (Siegel *et al*, 1994). El GABA activa dos tipos diferentes de receptores: el GABA_A y el GABA_B, siendo particularmente importante para los fines de este trabajo el receptor GABA_A y que por consiguiente será al único que nos referiremos.

El receptor GABA_A no es una entidad molecular discreta, sino que constituye una familia de receptores asociados a un canal que permite el flujo de cloruro hacia el interior de la célula (Silvilotti y Nistri, 1991). Cabe señalar que dentro de esta familia existe otro tipo de receptores inicialmente llamados receptores GABA_C, pero que ahora se les prefiere considerar como una variedad de los receptores GABA_A, y que por estar formados de subunidades rho (ver abajo) se les denomina receptores GABA_A rho (Barnard *et al*, 1998). Dichos receptores, como ocurre con el resto de las variantes de los receptores GABA_A, están asociados directamente con canales iónicos para el cloruro y poseen propiedades farmacológicas y funcionales características (Cuadro 2).

Cuadro 2 Farmacología de los receptores GABAérgicos			
	GABA _A	GABA _B	GABA _A rho
Activado por:	GABA Muscimol Isoguvacina	GABA (-)-Baclofen Ácido butanoico Ácido fosfinico (SKF 97541)	GABA Ácido 4 cis-aminocrotónico Ácido 4 trans-trans-aminocrotónico
Inhibido por:	Bicuculina Gabazina (SR 95531) (+)-β-Hidrastina	Faclofen Saclofen 2-Hidroxisaclofen	TPMPA* Imidazol-4-ácido acético Ácido metilfosfinico

Elaborado a partir de Wermuth y Biziere (1986); Seabrook *et al* (1990); Bormann y Feigenspan (1995); Ragozzino *et al* (1996). * Ácido 1,2,5,6-tetrahidro-piridina-4-il- metilfosfinico

Propiedades farmacológicas y funcionales de los receptores GABA_A y GABA_A rho

Los receptores GABA_A son de gran importancia, ya que cumplen un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad cerebral (McDonald y Olsen, 1994), y muchas drogas importantes, tales como benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides,

etanol y algunos de los anticonvulsivantes y anestésicos generales interactúan con ellos para ejercer sus efectos farmacológicos (Cuadro 3).

Cuadro 3			
Drogas que interactúan con los receptores GABA _A convencionales.			
Droga	Tipo	Tipo de ligando	Acción
<i>Sitio de unión de benzodiazepinas</i>			
Diazepam	BZ	Agonista	Ansiolítico
Midazolam	BZ	Agonista	
Flunitrazepam	BZ	Agonista	
Bretazenil		Agonista parcial	
Flumazenil		Antagonista	
Ro 15-4513	ImidazoBZ	Agonista inverso parcial	Hipnótico
Zolpidem	Imidazopiridina	Agonista	
CL 218.872	Triazolopiridazina	Agonista	
βCCM	β carbolina	Agonista inverso	
DMCM		Agonista inverso	
<i>Barbitúricos y sitios de modulación de esteroides</i>			
Loreclezole			Anticonvulsivante
Alphaxalone			Anestésico

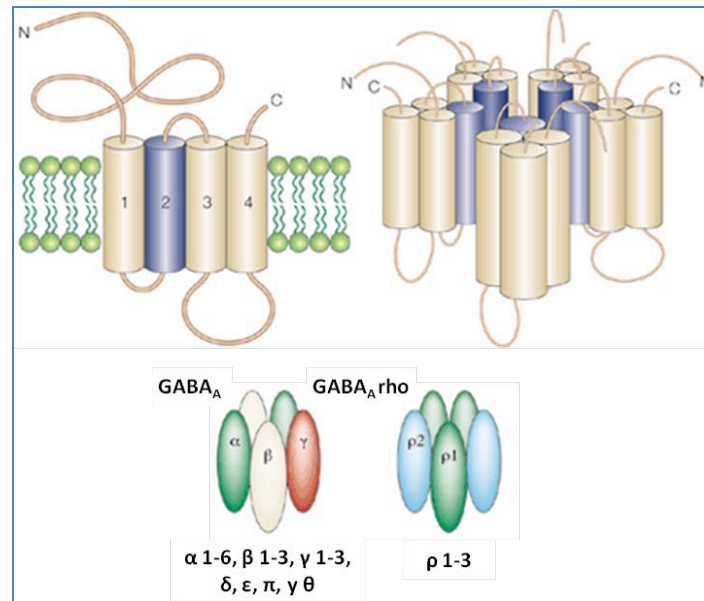
Tomado de Smith (2001)

El receptor GABA_A es una proteína transmembranal heterooligomérica formada por cinco subunidades proteicas (Richards et al, 1991) organizadas de tal manera que delimitan un canal que atraviesa la membrana y que, debido a sus propiedades, permite específicamente el paso de aniones cloruro (Cl⁻) de manera selectiva al interior de la célula (Schmid et al, 1998) (Figura 3).

Los receptores GABA_A contienen sitios de reconocimiento para el GABA y como podría predecirse por sus propiedades, también para otras sustancias de interés médico como las benzodiazepinas y los barbitúricos, que se comportan como agonistas indirectos, así como para sustancias antagonistas competitivas como la bicuculina, y no competitivas como la picrotoxina. Dichos receptores, poseen además sitios de reconocimiento para algunos esteroides neuroactivos del tipo de la alopegnanolona (Freeman et al, 1993) y la progesterona (Picazo y Fernández-Guasti, 1995). Cuando el GABA se une al receptor, su canal se abre y permite el paso de iones Cl⁻ a través de ellos.

La unión de las benzodiazepinas a sus sitios de reconocimiento incrementa el tiempo de apertura de estos canales y potencia la acción del GABA en sus sinapsis (Alvano, 2003).

Figura 3: Receptores GABA_A



Los receptores GABA_A están formados por 5 subunidades. Cada subunidades está formada 4 regiones transmembranales, de las cuales la region 2 es la encargada de formar el canal. Ambas terminales (amino y carboxilo terminal) son extracelulares.

Modificado de Moss y Smart (2001).

A diferencia de los receptores GABA_A convencionales, los receptores GABA_A rho no son inhibidos por la bicuculina y a diferencia de los receptores GABA_B no son activados por el (-)baclofen (Chebib y Johnston, 2000). Los receptores GABA_A rho son activados por el ácido carboxílico (+)-cis-2-aminometilciclopropano ((+)CAMP) (Duke et al, 2000) y por el ácido cis-4-aminocrotónico (CACA) (Chebib y Johnston, 2000).

Los receptores GABA_A rho son 10 veces más sensibles al GABA comparados con los receptores GABA_A convencionales, y muestran una conductancia baja (Polenzani et al, 1991; Qian y Dowling, 1993) y tiempos de apertura bastante largos (Feigenspan y Bormann, 1994; Polenzani et al, 1991; Qian y Dowling, 1993; Wang et al, 1994; Woodward et al, 1992). También se ha demostrado que el GABA es más potente al activar a los receptores GABA_A rho que a los receptores GABA_A convencionales (Feigenspan et al, 1993; Feigenspan y Bormann, 1994).

Los receptores GABA_A rho son canales iónicos asociados al Cl⁻, formados por ensamblajes homo-oligoméricos y hetero-oligomericos de subunidades GABA rho (Chebib,

2004; Cutting et al, 1991; Enz et al, 1995; Enz y Cutting, 1998; Olsen y Sieghart, 2008, Wang et al, 1994). Como ya se mencionó, no son sensibles a los agonistas de los receptores GABA_B, como el baclofen, ni a los agonistas del receptor GABA_A, como la bicuculina (Chebib, 2004; Drew et al, 1984, Drew y Johnston, 1992; Olsen y Sieghart, 2008; Polenzani et al, 1991, Wang et al, 1994) pero son selectivamente bloqueados por el (ácido(1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-il) metilfosfinico (TPMPA), un compuesto diseñado de forma específica para bloquear los subtipos de receptores GABA_A rho (Chebib, 2004; Ragozzino et al, 1996).

A pesar de que inicialmente los receptores GABA_A rho fueron encontrados y caracterizados en la retina (Enz et al, 1995; FeingSPAN y Bormann, 1994; Lukasiewicz et al, 1994; Polenzani et al, 1991; Qian y Dowlin, 1993, Wang et al, 1994, Woodward et al, 1992; Zhang et al, 1995), evidencia convergente indica que también pueden estar presentes en varias regiones cerebrales, incluyendo la amígdala (Enz et al, 1995; Enz y Cutting, 1999; Esmaeili et al, 2009; Rosas-Arellano et al, 2007).

Así, los receptores GABA_A rho1 han sido detectados inmunohistoquímicamente en la amígdala posterior y los receptores GABA_A rho2 han sido encontrados con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) dentro del núcleo basolateral y el núcleo central de la amígdala (Esmaeili et al, 2009).

Neurofisiológicamente, la aplicación ionoforética de GABA a rebanadas de amígdala y la estimulación eléctrica de las islas paracapsulares intercaladas mediales, que como se indicó antes, son grupos de neuronas GABAérgicas que están interpuestas entre el núcleo basolateral y el núcleo central y parecen controlar el flujo de los impulsos nerviosos entre estos núcleos (Paré et al, 2004, Pérez de la Mora et al, 2008; Pérez de la Mora et al, 2010), inducen dentro del núcleo central corrientes postsinápticas inhibitorias que fueron insensibles a la bicuculina y parcialmente bloqueadas por la aplicación del TPMPA (Delaney y Sah, 1999; Delaney y Sah, 2001).

Dado que los receptores GABA_A rho tienen una baja tasa de desensibilización (Polenzani et al, 1991; Qian y Dowling, 1993) y son más eficientes que los receptores GABA_A convencionales (FeingSPAN y Bormann, 1994; Polenzani et al, 1991; Qian y Dowling, 1993; Wang et al, 1994; Woodward et al, 1992) para inducir respuestas inhibitorias, se considera que su activación puede ejercer efectos tónicos inhibitorios a varios niveles de la amígdala y así modular su salida ansiogénica.

Composición de subunidades

Como se indicó antes, el receptor GABA_A está compuesto por varias subunidades cuya secuencia de aminoácidos ha sido deducida y muestra una identidad significativa (20%-30%) cuando se le compara con la secuencia de otros canales iónicos tales como el receptor nicotínico, el receptor a la glicina, y los receptores 5HT₃ a la serotonina.

En el cerebro de los mamíferos se han clonado varias clases de subunidades e isoformas correspondientes a cada una de las clases de receptores GABA_A. La identidad de los aminoácidos a través de las isoformas de la misma clase es aproximadamente de un 70%, mientras que la identidad a través de clases es aproximadamente del 30%.

Para el receptor GABA_A se han clonado diversas subunidades: seis α ; cuatro β ; tres γ ; una δ y una ϵ (Barnard et al, 1998) y se ha reportado la presencia de variantes para la misma subunidad, de manera que, la subunidad γ_2 , por ejemplo, se expresa como γ_{2S} (forma corta) y γ_{2L} (forma larga) (Gutierrez et al, 1994). Bioquímicamente, la forma γ_{2L} contiene ocho aminoácidos más entre la región transmembranal 3 y la región transmembranal 4, lo que le proporciona un sitio potencial adicional de fosforilación (Whiting et al, 1990). La subunidad α_6 también tiene dos variantes, sin embargo la forma corta de la subunidad α_6 no forma receptores funcionales (Korpi et al, 1994).

Se ha sugerido que los receptores ensamblados a partir de varias isoformas de la subunidad rho sean clasificados como receptores GABA_A rho (Shimada et al, 1992), ya que estos son insensibles a la bicuculina y al baclofen, un ligando para los receptores GABA_B, pero contienen la subunidad rho que pertenece a la familia de las subunidades del receptor GABA_A.

Estudios de "inmunoblot" con anticuerpos específicos para las subunidades del receptor GABA_A han revelado su peso molecular (Cuadro 4) y el porcentaje de los sitios de unión inmunoprecipitados por anticuerpos específicos en relación a las otras subunidades del receptor GABA_A en cerebros adultos (Cuadro 5). La investigación de la distribución de la mayor parte de las subunidades (Cuadro 6) que participan en la formación del receptor GABA_A ha indicado que existe selectividad para ellas en distintas regiones del cerebro.

Hasta el momento se han identificado 2 tipos de subunidades rho en la retina del humano, el ratón y el pollo; 3 tipos de subunidades rho en la rata, con una variante para rho 1; y 5 tipos de subunidades rho en la perca blanca. La secuencia genética entre las

subunidades rho del humano y de la rata es homóloga hasta en un 92%, al igual que entre las distintas especies, que es de entre el 60% y el 74% (Chebib, 2004).

Cuadro 4						
Peso molecular de las subunidades del receptor GABA _A (kDa).						
	1	2	3	4	5	6
α	50-51	52-52	58-61	66-67	53-55	57-58
β	57	54-57	57			
γ	45-51	43-49	43-46			
δ	54					
ϵ	?					
ρ	?					
π	?					

Elaborado a partir de Mehta y Ticku (1999)

Cuadro 5						
Porcentaje de los sitios de unión inmunoprecipitados por anticuerpos específicos en relación a las otras subunidades del receptor GABA _A en el cerebro adulto.						
	1	2	3	4	5	6
α	70-97	4-28	12-24	0-15	4-14	30-39
β	2-32	55-96	19-52			
γ	0-19	50-94	0-18			
δ	0-23					
ϵ	?					
ρ	?					
π	?					

Elaborado a partir de Mehta y Ticku (1999)

Cuadro 6		
Distribución de algunas de las subunidades del receptor GABA _A		
SUBUNIDAD	LOCALIZACIÓN	FUENTE
α_1	Áreas corticales y tálamo.	Rudolph et al, 1999
	Bulbo olfatorio, neocorteza, formación hipocampal, cerebelo.	Tecott, 2000
α_2	Sistema límbico	Löw et al, 2000
	Núcleo central de la amígdala	Rudolph et al, 2001
α_3	Sistema reticulado activador	Löw et al, 2000
α_4	Corteza cerebral, hipocampo y tálamo.	Mehta y Shank, 1995
α_5	Sistema límbico	Rudolph et al, 1999
α_6	Células granulares cerebelares	
β_3	Mayoría de las áreas cerebrales	Rudolph et al, 2001
Δ	Cerebelo y tálamo	
γ_1	Amígdala y septum	Ymer et al, 1990
γ_{2S}	Mayoría de las regiones de cerebro	
γ_{2L}	Abundante en el hipocampo, corteza cerebral y bulbo olfatorio	Gutierrez et al, 1994
π	Pulmones, timo, próstata y útero.	Hedblom y Kirkness, 1997
ρ	Retina y cerebro	Wisden et al, 1996
		Enz y Cutting, 1999
		Esmaeili et al, 2009

Estructura oligomérica y función

Como se mencionó anteriormente, los receptores GABA_A constituyen el sitio de reconocimiento de diversos compuestos ansiolíticos, sedantes y anticonvulsivantes (Klein et al, 1995; Gulinello et al, 2003), es por esto que la regulación de la ansiedad está asociada estrechamente con la función del receptor GABA_A (Sanders y Shekhar, 1995). En

apoyo de lo anterior existe evidencia que señala que distintas isoformas del receptor GABA_A, localizadas en regiones específicas del cerebro, podrían modular a la ansiedad en forma diferencial (Crestani et al, 1999).

Tales características funcionales son atribuidas a la combinación diferencial de las subunidades que integran a los receptores GABA_A. La elucidación de los ensamblajes que caracterizan al receptor GABA_A ha resultado una tarea sumamente desafiante ya que, en teoría, son muchos los diferentes tipos de ensamblajes que se pueden deducir de la combinación de sus subunidades. Hay reportes que indican que las subunidades α_1 , $\beta_{2/3}$ y γ_2 coexisten en la mayoría de los receptores (Khan et al, 1993; Benke et al, 1994) aunque también se ha visto que se pueden coexpresar dos isoformas diferentes de la subunidad α - (Araujo et al, 1996), β - (Li y De Blas, 1997) o γ - (Benke et al, 1996) en el mismo receptor. Así pues, la combinación de subunidades predominante en la mayoría de los receptores GABA_A comprende dos subunidades α , dos subunidades γ y una subunidad β (Backus et al, 1993) o dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ (Chang et al, 1996).

Los receptores GABA_A rho están formados exclusivamente de subunidades rho. A la fecha se han identificado 3 subunidades rho las cuales se ensamblan para formar un pentámero conformado por el mismo tipo de subunidad, a lo cual se le llama homopentámero, o puede estar formado por más de una subunidad rho, a lo cual se le llama heteropentámero. También hay evidencia de que la subunidad rho1 puede formar heteropentámeros con la subunidad γ_2 (Qian y Ripps, 1999).

La estequiometría de las subunidades que constituyen al receptor GABA_A probablemente varía en las diferentes regiones del cerebro, pero hasta el momento sólo se han sugerido algunas combinaciones de subunidades que se considera son las que se presentan con mayor abundancia en la mayoría de las regiones cerebrales.

Estudios recientes han demostrado por otro lado que la subunidad δ no se colocaliza con la subunidad γ (Araujo et al, 1998), y que se necesita la coexpresión de las subunidades α , β y γ para formar receptores GABA_A completamente funcionales.

La combinación de subunidades en los receptores determina sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, siendo para el caso de los receptores GABA_A el tipo de subunidades α es el más determinante (Cuadro 7). Por ello, durante los últimos años se ha investigado la localización de los sitios de unión para diversos ligandos del receptor

GABA_A, usando radioligandos que se unen a receptores que son posteriormente inmunoprecipitados mediante anticuerpos dirigidos en contra de subunidades específicas.

Tales estudios indican que la alta afinidad del sitio de unión para GABA/muscimol se encuentra en la interfase de las subunidades α y β (Ruano et al, 1995), y se ha sugerido que la subunidad β es necesaria para la unión del TBPS (Slany et al, 1995). Por otro lado, el sitio de unión para benzodiazepinas está localizado en la interfase que se forma entre las subunidades α y γ (Wong y Skolnick, 1992). Se ha descrito además, que existen receptores GABA_A con dos isoformas de la subunidad α y γ haciendo posible la existencia de dos sitios de unión para las benzodiazepinas en el mismo receptor (Khan et al, 1996).

De esta manera, se han descrito dos sitios diferentes para la unión de las benzodiazepinas en el receptor GABA_A. Los sitios tipo 1 (BZ I) tienen una afinidad mayor para sustancias tales como CL 218872, β -CCM y zolpidem, en comparación con los receptores de tipo 2 (BZ II) (Benke et al, 1994). Por otro lado, los receptores que contienen a la subunidad α_1 forman receptores BZ I, mientras que los receptores BZ II necesitan de la expresión de las subunidades α_2 , α_3 o α_5 (Marksitzer et al, 1993; Mertens et al, 1993). Es interesante, sin embargo, que los receptores que contienen la subunidad α_5 pierden la afinidad para el zolpidem y sus análogos (Hadingham et al, 1993) pero mantienen una alta afinidad para el Ro 15-4513 (Mehta y Shank, 1995), un agonista inverso parcial del sitio de unión para las benzodiazepinas.

Benzodiazepinas convencionales tales como el diazepam, flunitrazepam y clonazepam no se unen a los receptores GABA_A que contienen las subunidades α_4 y α_6 , mientras que el Ro 15-4513 y algunos agonistas parciales para el receptor a benzodiazepinas tienen una alta afinidad para estos receptores insensibles al diazepam (Khan et al, 1996; Quirk et al, 1994). El [³H]muscimol por su parte se une con una alta afinidad a los receptores que tienen la subunidad α_4 (Wisden et al, 1991) y la subunidad α_6 (Khan et al, 1996), amén de asociarse con receptores que posee las otras subunidades.

Por otro lado, ha sido descrito que los receptores que contienen la subunidad γ_3 tienen una reducida afinidad para el clonazepam y el flunitrazepam y pierden la sensibilidad al zolpidem (Benke et al, 1996), mientras que los receptores que contiene la subunidad γ_1 tienen una baja afinidad para las benzodiazepinas, excepto el flunitrazepam, y se diferencian de los receptores que contienen las subunidades γ_2 y γ_3 por su baja afinidad hacia el agonista inverso β -CCM y por su pérdida de afinidad para el agonista inverso parcial flumazenil (Benke et al, 1996). Finalmente, el ensamble de

subunidades π con subunidades α , β ó γ lleva a una densidad reducida de los sitios de unión para [^3H]flumazenil (Hedblom y Kirkness, 1997).

Cuadro 7
Ligandos y localización de las subunidades α

Subunidad	Tipo de receptor a BZ	Ligando reconocido	Localización de expresión	
			alta/intermedia	baja
α_1	I	Flumazenil	Cerebelo Tálamo Amígdala	Hipocampo Corteza cerebral
		Zolpidem		
		DMCM, flunitrazepam		
		CL218,872 (a) Diazepam (a)		
α_2	II	Flumazenil	Hipocampo Amígdala	Cerebelo Corteza cerebral
		Diazepam (a)		
		Zolpidem (b), CL218,872 (b)		
		DMCM, flunitrazepam		
α_3	II	Flumazenil	Hipocampo Amígdala	Cerebelo Corteza cerebral
		Diazepam (a)		
		Zolpidem (b), CL218,872 (b)		
		DMCM, flunitrazepam		
α_4	Insensible	Flumazenil	Tálamo Hipocampo Striatum	Cerebelo Corteza cerebral Amígdala
		β CCM (b)		
		Bretazínil (i)		
		Ro 15-4513 (a)		
α_5	II (atípica)	Flumazenil, RY80	Hipocampo Bulbo olfatorio	Cerebelo Tálamo Núcleo hipotalámico Corteza cerebral Amígdala
		Diazepam (a)		
		L655,708 (s)		
		Ro 15-4513 (ra > 15X $\alpha_{1,2,3}$)		
		Zolpidem (< 30X $\alpha_{2,3}$)		
		DMCM, flunitrazepam		
α_6	insensible	Antagonistas, por ejemplo flumazenil (mb) o agonista inverso (Ro 15-4513)	Cerebelo	

a:alta; i:intermedio; b:baja; ra:relativamente alta; s:selectiva; mb:muy baja

(Barnard et al, 1998; Khan et al, 1996; Smith, 2001; Thomas et al, 1985)

Se ha encontrado que el ácido carboxílico (+)-cis-2-aminometilciclopropano ((+)-CAMP) se comporta como un agonista para el GABA que activa en forma total solo a los receptores que contienen las subunidades rho 1 y rho 2, y activa de manera parcial a los receptores formados con subunidades rho 3 (Pan y Qian, 2005). Otros fármacos como la isoguvacina son capaces de activar a los receptores GABA_A convencionales, pero sólo lo hacen de manera parcial con los receptores GABA_A rho.

Existen fármacos capaces de distinguir entre receptores formados con distintos tipos de subunidades rho. El (-)-TAMP o el 2-Metil-TACA funcionan como agonistas parciales de homolímeros formados por subunidades rho1 y rho2, pero nuevamente, solo se logra bloquear de manera parcial a los receptores que contienen la subunidad rho3 (Zhang et al, 2001). Ya que las propiedades farmacológicas no son consistentes en los receptores GABA_A rho, se ha sugerido que al igual que los receptores GABA_A convencionales, las acciones diferenciales de los agentes farmacológicos sobre dicho receptor son determinadas por la muy particular composición molecular de estos (Pan y Qian, 2005). Finalmente cabe señalar que el TPMPA fue diseñado para ser un bloqueador selectivo para los receptores GABA_A rho. Los estudios realizados con éste fármaco han sido de vital importancia para mostrar el papel que los receptores GABA_A rho tienen en diferentes procesos fisiológicos.

Desde el punto de vista funcional el grupo de Yang (2003) ha sugerido que a nivel celular los receptores GABA_A rho están relacionados con la inhibición de la apoptosis inducida por amoníaco en neuronas hipocampales. Así mismo, se les ha relacionado con la modulación de la liberación la hormona tiotropina en la glándula pituitaria (Boue-Grabot et al, 2000). Finalmente, se ha demostrado que los receptores GABA_A rho pueden estar implicados en la regulación del ciclo sueño-vigilia en ratas, donde al parecer provocan un incremento de la vigilia y una reducción tanto del sueño de ondas lentas como del sueño de movimientos oculares rápidos (Chebib, 2004; Deschaux et al, 2006).

FENÓMENO DE TOLERANCIA AL PRIMER ENSAYO (“ONE-TRIAL TOLERANCE”)

El laberinto elevado en forma de “+” (EPM por sus siglas en inglés: Elevated Plus Maze) es una prueba conductual no condicionada que ha sido ampliamente validada para la evaluación de la ansiedad en los roedores (Pellow et al, 1985). La prueba se lleva a cabo en un laberinto en forma de “+” que se encuentra elevado á 50 cm del piso y que posee dos brazos abiertos y dos brazos cerrados, por paredes de 40 cm de alto, que se interceptan en un cuadrado central (10 x 10 cm). La prueba dura 5 minutos (Figura 4) y se inicia cuando se coloca al animal en el cuadrado central del laberinto. Ya que el EPM explota la aversión de los roedores por los espacios abiertos, las ratas evitan la exploración de sus brazos abiertos y pasan la mayor parte del tiempo confinadas dentro de sus brazos cerrados. Cuando a los animales se les trata con sustancias ansiolíticas, aumenta el tiempo que estos pasan en los espacios abiertos pues su ansiedad disminuye y se atreven a explorar por más tiempo aquellos espacios que les son aversivos de forma natural. Por

el contrario, cuando los animales son tratados con sustancias ansiogénicas, estos generalmente permanecen en los brazos cerrados del laberinto que estos representan para ellas su zona de confort en esta prueba

Figura 4: Laberinto Elevado en forma de "+"



El laberinto en forma de "+" está construido de madera y se encuentra elevado a 50 cm del piso y posee dos brazos abiertos y dos brazos cerrados por paredes de 40 cm de alto. Los brazos se interceptan en un cuadrado central de 10 cm de lado.

En 1987, Lister encontró un fenómeno extraño mientras trabajaba con ratones en el EPM. Este investigador notó que aquellos animales que habían sido expuestos al EPM sin haber recibido tratamiento farmacológico alguno perdían la capacidad de generar respuestas ansiolíticas cuando eran tratados con clordiazepóxido y sometidos subsecuentemente al EPM. (Lister, 1987).

Tres años más tarde, File y sus colaboradores confirmaron el mismo fenómeno en ratas, encontrando además que este efecto permanecía aun si el intervalo entre la primera y la segunda exposición al laberinto era de 2 semanas (File et al, 1990). Este fenómeno denominado tolerancia al primer ensayo (one-trial tolerance) se definió como la pérdida de los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas en animales que tuvieron una experiencia previa libre de drogas en el laberinto elevado en forma de "+" (File, 1993).

Más aun, en estudios posteriores se demostró que este fenómeno ocurre también cuando los efectos de las benzodiazepinas son estudiados en otras pruebas conductuales como la caja luz-oscuridad (Rodgers y Sheperd, 1993), la prueba de las cuatro plataformas (Hascoet et al, 1997) y la prueba de evasión al olor de gato (McGregor y Dielenberg, 1999) utilizando roedores no tratados que han sido previamente expuestos a la misma prueba. La conclusión a la que se llegó es que las benzodiazepinas pierden su

efecto ansiolítico cuando se aplican a animales previamente sometidos a una experiencia previa libre de medicamentos en la misma prueba.

Como explicación a sus observaciones en el laberinto elevado en forma de "+", González y File sugirieron que la experiencia inicial en el laberinto altera la respuesta o del receptor GABA_A a las benzodiazepinas, posiblemente como resultado del aumento de la liberación de un agonista inverso endógeno. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha encontrado evidencia de que tal agonista exista (Gonzalez y File, 1997).

Cómo ya se mencionó anteriormente, las benzodiazepinas actúan en el organismo a través de los receptores GABA_A, y se ha demostrado que este receptor muestra cambios en respuesta a muchos estresores, tales como el nado forzado (Medina et al, 1983), la inmovilización (Braestrup et al, 1979), el sonido de fondo (Lai y Carino, 1990) y a la manipulación (Biggio et al, 1990).

Se ha demostrado que el estrés por manipulación aguda disminuye la unión de [³H]flunitrazepam al receptor GABA_A en membranas corticales como consecuencia de una disminución del número de sus receptores (B_{max}) y sin que exista una modificación de la afinidad de estos (K_D) por su ligando. Estos efectos son contrarios, a los observados cuando los animales son manipulados por 21 días, ya que bajo estas condiciones aumenta la unión del [³H]flunitrazepam como consecuencia de un mayor número de receptores sin existir alguna modificación en su afinidad (Andrews et al, 1992). Asimismo, se sugirió que la rápida disminución de los sitios a las benzodiazepinas que se encuentran después de una manipulación aguda podría ser consecuencia de la internalización y alteración consecutiva en la conversión (turnover) del receptor (Mennini et al, 1988).

En contradicción con los datos de Andrews y sus colaboradores (Andrews et al, 1992) comentados antes, Chacur y sus colaboradores encontraron en la rata, mediante el empleo de la autoradiografía, que tras una exposición de 5 minutos al laberinto elevado en forma de "+" ocurría un aumento significativo en la unión del [³H]flunitrazepam a su receptor, tanto en la amígdala como en el hipocampo (Chacur et al, 1999), en ausencia de cambios correlativos en la unión del [³H]muscimol a sus sitios de unión en el receptor GABA_A, indicando que la experiencia aversiva sufrida durante la exposición al laberinto afectaba selectivamente el sitio de unión a las benzodiazepinas y no así el sitio de unión para el GABA.

Finalmente, resulta de considerable interés que en animales sometidos al nado forzado y probados 24 horas después en la caja luz oscuridad, la administración de diazepam no tuvo efectos ansiolíticos y que dichos cambios ocurrieron en paralelo con un aumento en la unión al [³H]flunitrazepam tanto en la amígdala como en el hipocampo (Briones-Aranda et al, 2005).

Aunque existe información acerca del papel que tienen en la modulación amigdalina de la ansiedad los receptores GABA_A convencionales, constituidos por la asociación de subunidades α , β y γ , no se tiene información sobre el papel de estos receptores en esta modulación cuando sus subunidades α , β y γ han sido sustituidas por subunidades rho exclusivamente, como ocurre en forma natural en los receptores GABA_A rho

Asimismo, se consideró importante estudiar la posibilidad de que cambios cinéticos en los receptores GABA_A convencionales pudieran estar involucrados en la respuesta de los roedores a condiciones experimentales específicas tales como aquellas que ocurren en el fenómeno de la tolerancia al primer ensayo.

HIPÓTESIS

El papel de los receptores GABA_A en la modulación amigdalina de la ansiedad depende de la naturaleza de su estructura cuaternaria y su respuesta ante situaciones o estímulos específicos involucra la generación de cambios cinéticos adaptativos.

OBJETIVOS

Estudiar el papel de la estructura cuaternaria (agregación de subunidades) del receptor GABA_A en la modulación amigdalina de la ansiedad.

Estudiar la posible generación de cambios cinéticos adaptativos en el receptor GABA_A como consecuencia de su exposición ante situaciones ambientales específicas.

METAS

Determinar en la rata los efectos conductuales que resultan del bloqueo diferencial de los receptores GABA_A convencionales y GABA_A rho en la modulación amigdalina de la ansiedad.

Determinar en la rata la posible generación de cambios cinéticos en los receptores GABA_A convencionales en regiones involucradas en la ansiedad (amígdala e hipocampo) tras la exposición de las ratas al laberinto elevado en forma de "+".

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

En este estudio se usaron ratas macho Wistar (250-270g) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas se mantuvieron en un ambiente controlado [22°C de temperatura y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz encendida a las 6:00 horas)] con agua y comida *ad libitum*. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité Ético del Instituto de Fisiología Celular, los cuales están basados en las recomendaciones hechas por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Publications No.80-23, revisado en 1996). En todos los experimentos se realizaron esfuerzos para minimizar el número de animales usados y su sufrimiento. Tanto en los experimentos conductuales como en los experimentos de medición de corticosterona, las ratas fueron asignadas de manera aleatoria a cada grupo. Los experimentos se llevaron a cabo entre las 10:00 y las 16:00 horas.

El TPMPA y la bicuculina fueron adquiridas de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El kit Coat-A-Count® Rat Corticosterone se adquirió de Diagnostics Products Corporation (Los Angeles, CA, USA). El Midazolam fue comprado a Roche (México) y el [³H]flunitrazepam 73.3 Ci/mol fue comprado a Amersham (USA).

MÉTODOS

Cirugía y Microinyección.

Para la implantación de una cánula guía permanente dentro de la amígdala, las ratas fueron anestesiadas con ketamina hidroclorada (170 mg/kg, i.p.) y colocadas en un marco estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) con la barra incisiva colocada a -3.3 mm. Se mantuvo la temperatura corporal de los animales a 37°C usando un controlador de temperatura CMA/150 (CMA/Microdialysis, Stockholm, Suecia). Se colocaron cánulas bilaterales de acero inoxidable de 0.46 mm de diámetro exterior (C315G, Plastic One, Roanoke, VA, USA) en el complejo basolateral anterior cerca de la isla intercalada principal de la amígdala (coordenadas: AP -2.12 mm, L ±4.7 mm desde el bregma, V -7.7 mm desde la superficie del cráneo, de acuerdo al atlas de [Paxinos y Watson, 1986](#)). Las cánulas guía fueron fijadas con tornillos de acero inoxidable y cemento acrílico dental (Laboratorios Arias, México) y selladas con "mandriles" hechos al tamaño

(C315DC, Plastic One, Roanoke, VA, USA). Para prevenir infecciones Se inyectó Estreptobezetazil V-Fortificado (Fort Dodge Animal Health Laboratories, México). Para evitar que las ratas mordieran las cánulas, los animales se colocaron en cajas individuales hasta el día en el que fueron sometidas a la microinyección.

Después de 7 días de recuperación de la cirugía y la anestesia, las ratas fueron manipuladas una vez al día durante 5 minutos por 3 días consecutivos. Se usaron diferentes grupos de ratas para los experimentos que involucraron pruebas conductuales y aquellos destinados a medir la corticosterona en el plasma.

El día del experimento los animales fueron inyectados bilateralmente a través de las cánulas, la microinyección se realizó 1 mm por debajo de la cánula guía. Los animales recibieron ya sea TPMPA (6-800 pmol por lado), metayoduro de bicuculina en solución salina (1.8 – 60 pmol por lado), o solución salina. En todos los casos el volumen inyectado fue de 250 nl por lado. Todas las sustancias fueron inyectadas en un periodo de 5 minutos, usando dos bombas de microdiálisis CMA (CMA/microdialysis). La cánula se mantuvo en su lugar 30 segundos después de la inyección para prevenir el flujo inverso de la sustancia inyectada y para facilitar la difusión del fármaco.

Las evaluaciones conductuales empezaron inmediatamente después de la inyección del TPMPA o la bicuculina. Las muestras de sangre para medir los niveles de corticosterona en el plasma fueron tomados 15 minutos después de que terminó el proceso de microinyección. El rango de dosis de TPMPA usado se basó en el trabajo de Gibbs y Johnston (2005), asociado a los efectos de este antagonista con la formación de memoria a corto plazo en pollos pequeños.

Laberinto elevado en forma de “+”.

El laberinto elevado en forma de “+” usado en este trabajo estuvo basado esencialmente en el diseño de Pellow y sus colaboradores (1985) y fue construido de madera. El laberinto poseía dos brazos abiertos (50 x 10 cm) y dos brazos cerrados (50 x 10 x 40 cm) pero con el techo abierto que se entrecruzaban en un cuadro central (10 x 10 cm). El laberinto se elevaba 50 cm del piso merced a un pedestal unido al cuadro central. Para facilitar la exploración del laberinto y evitar la caída de los animales, sus brazos abiertos poseían un pequeño levantamiento en los bordes de 0.5 x 0.5 cm. El nivel de iluminación en el cuadro central del laberinto fue de 5.1 luxes. Las ratas fueron colocadas

en el cuadro central con el rostro hacia un brazo abierto al inicio de la prueba, y se les permitió explorar libremente el laberinto por un periodo de 5 minutos (Pellow et al, 1985).

En la prueba se tomaron como medidas de ansiedad el número de entradas a los brazos abiertos (como porcentaje del número total de entradas a los brazos) y el tiempo en los brazos abiertos (como porcentaje del tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos y en los brazos cerrados). El número total de entradas a los brazos fue tomado como medida de locomoción. Las entradas a los brazos del laberinto fueron contadas cuando las 4 patas del animal estuvieron dentro del brazo en cuestión. Después de cada prueba el laberinto fue limpiado con detergente y se dejó secar antes de iniciar la siguiente prueba.

Los experimentos se llevaron a cabo en una habitación con atenuación de ruido y equipada con un equipo de video remoto. El laberinto se colocó bajo la cámara de video y la conducta de los animales fue videograbada en ausencia de observadores.

Prueba de Campo Abierto.

Para evaluar los efectos del TPMPA y la bicuculina en la locomoción, los animales fueron evaluados en un campo abierto inmediatamente después de haber sido sometidos al laberinto elevado en forma de "+". La locomoción en esta prueba se llevó a cabo en una caja de acrílico (50 x 50 x 30 cm), equipada con celdas fotoeléctricas para detectar el movimiento horizontal de los animales a través del campo abierto (OMNIALVA, México). Cada pared contenía para este propósito 10 celdas fotoeléctricas colocadas a 4 cm sobre el piso de la caja de acrílico y separadas 5 cm una de la otra. Mediante una PC, las interrupciones de las trayectorias de los rayos luminosos entre las celdas fueron cuantificadas y transformadas en eventos de locomoción con una frecuencia de muestreo de 10 Hz. El nivel de iluminación al interior de la caja fue de 138 luxes. Los animales al inicio de la prueba fueron colocados en el centro la caja y se les permitió explorar libremente la caja por 5 minutos.

Niveles de corticosterona en el plasma.

Las muestras de sangre para medir los niveles de corticosterona en el plasma fueron obtenidos de la cola de un grupo independiente de ratas, pero que fueron tratadas y manipuladas de la misma manera que aquellos que se usaron en las pruebas conductuales, tal como lo describen Vahl y sus colaboradores (2005), con algunas pequeñas modificaciones. Debido a la lentitud con la que se inician las respuestas

humorales, las muestras de sangre se tomaron 15 minutos después de la microinyección del TPMPA. La cola de la rata se lavó y se aplicó anestesia local con gel de benzocaína. Después de 2 a 3 minutos, 2 cm del final distal de la cola fue removido con la ayuda de una navaja fina. Las muestras de sangre fueron obtenidas masajeando el extremo proximal de la cola y recogiendo las gotas de sangre durante 3 minutos en una tubo BD Microcontainer® que contenía K₂ EDTA. El plasma se obtuvo por centrifugación (3,500 rpm/5min) y los niveles de corticosterona se midieron por radioinmunoensayo en 50 µl de plasma, usando el kit Coat-A-Count® Rat Corticosterone, siguiendo las instrucciones del fabricante. Bajo estas condiciones, los niveles de corticosterona en el plasma tan bajos como 5.7 ng/ml pueden ser medidos con precisión .

Evaluación histológica.

Para verificar que las cánulas estuvieran en el lugar deseado, al final de los experimentos conductuales o de la medida de niveles de corticosterona en el plasma, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (65 mg por animal, Laboratorios Ttokkyo, México) y se microinyectaron bilateralmente 200 nl de una solución diluida de azul de pontamina a través de las cánulas. Los cerebros fueron removidos y fijados en 10% de formaldehido. La posición de las cánulas fue verificada en cortes coronales (45 µm) hechos con un criostato (CM 1510-3 Leica Instruments, Nussloch, Alemania) y teñidos con violeta de cresilo. La crioprotección se llevó a cabo sumergiendo los cerebros en soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30%, un día en cada solución. Sólo las ratas con al menos una punta de la cánula en las áreas de interés fueron incluidas en los análisis estadísticos. El total de animales que cumplieron esta característica fue de 143.

Validación de los efectos ansiolíticos del midazolam en el laberinto elevado en forma de “+”.

Para validar los efectos ansiolíticos del midazolam en el Laberinto elevado en forma de “+” se usaron animales que fueron manipulados por 5 minutos diarios durante 3 días previos al experimento. El día del experimento los animales se dividieron de manera aleatoria en 4 grupos, el grupo control recibió una dosis de solución salina (NaCl 0.9% en 1ml/kg), los otros tres grupos recibieron diferentes dosis de midazolam (0.5, 1.0 y 1.25 mg/ml). El volumen inyectado fue en todos los casos de 1.25ml/kg. La inyección fue intraperitoneal y se realizó 30 minutos antes de que los animales entraran al laberinto

Evaluación cinética de los efectos ansiolíticos del midazolam en ratas no tratadas farmacológicamente pero expuestas al laberinto elevado en forma de “+”.

Al inicio del experimento, los animales fueron sometidos al laberinto elevado en forma de “+” sin haber recibido ningún medicamento. Se permitió que los animales exploraran libremente el laberinto por 5 minutos y se registró su conducta a través de la videocámara, denominándose a esta experiencia T1. Los animales fueron regresados a sus cajas. Dependiendo del grupo al que pertenecían, los animales fueron inyectados con solución salina o midazolam a distintos tiempos después de haber sido expuestos al laberinto (6, 12 ó 24 horas). Treinta minutos después de la inyección, los animales fueron introducidos nuevamente al laberinto elevado en forma de “+” permitiéndoles su exploración por 5 min. A esta experiencia se le denominó T2.

Autorradiografía para los receptores GABA/benzodiazepinas.

Para evaluar la posible existencia de cambios en la unión de las benzodiazepinas a sus receptores en animales con una experiencia libre de fármacos en el laberinto elevado en forma de “+”, los animales usados fueron manipulados cotidianamente por 5 minutos durante los 3 días previos al experimento. El día del experimento los animales fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos y se permitió explorar el laberinto elevado en forma de “+” durante 5 minutos. Los animales del primer grupo fueron sacrificados inmediatamente después de la exploración del laberinto. Los animales del segundo, tercero y cuarto grupo fueron sacrificado a su vez 6, 12 y 24 horas después de la exploración del laberinto respectivamente.

Los cerebros de los animales fueron rápidamente removidos, congelados en hielo seco y almacenados a -70°C hasta ser usados. Los cerebros fueron cortados en secciones coronales (20 µm) en un crióstato (CM 1510-3 Leica Instruments, Nussloch, Alemania). Para la autorradiografía sólo se usaron aquellas rebanadas que correspondían a la región del cerebro comprendida entre los niveles AP -1.80mm y -3.14 mm del bregma, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). Las rebanadas fueron colocadas en portaobjetos con gelatina y almacenadas nuevamente a -70°C hasta que fueron procesados autorradiográficamente.

La autorradiografía se realizó de acuerdo con Rocha y colaboradores (1994), usando cuatro concentraciones diferentes de [³H]flunitrazepam (10nm, 5nm, 2.5nm y 1.75 nm). Las rebanadas fueron lavadas en una solución amortiguadora de Tris HCl 170nm pH

7.4, Tris HCl 20.6 g/l y Tris Base 4.73 g/l por 30 min a 25°C e incubadas por 45 minutos a 4°C con [³H]flunitrazepam a una concentración apropiada. Al final de la incubación las rebanadas fueron lavadas 2 veces con la solución amortiguadora (1 minuto a 4°C), sumergidas en agua a la misma temperatura por 3 segundos adicionales y dejadas secar al aire. Finalmente, las rebanadas en laminillas fueron expuestas a películas sensibles al tritio (Biomax MR Film, Kodak) por 3 semanas en un cuarto oscuro a temperatura ambiente. Al final de su exposición, las películas fueron reveladas usando el revelador Kodak (D19) lavadas y secadas de acuerdo a las instrucciones de los laboratorios Kodak para sus productos.

La densidad óptica de las películas reveladas fue determinada mediante un programa de análisis de imagen (JAVA Jandel Video Analysis Software, Jandel Scientific Center Madera CA) realizándose 10 lecturas en promedio para cada área cerebral estudiada. Las unidades de densidad óptica fueron convertidas a fentomoles por miligramo de proteína (fm/mg de proteína) con la ayuda de estándares de tritio revelados junto con las películas.

Análisis estadísticos.

Aunque la distancia KS obtenida usando la prueba de Kolmogoroff-Smirnoff sugirió que en los experimentos conductuales la población bajo estudio tenía una distribución normal, se decidió analizar estos datos mediante estadística no paramétrica, dada la cantidad limitada de observaciones (Motulsky, 2003). Para ello se usó la prueba de Kruskal-Wallis seguida, cuando fue necesario, de la prueba de Dunn como prueba post hoc para comparar los grupos tratados con TPMPA o bicuculina contra su grupo control respectivo. Los datos se consideraron estadísticamente significativos en todos aquellos casos donde P fue menor que 0.05 ($P < 0.05$). Los parámetros estadísticos se analizaron usando el software GraphPad Prism versión 4.0.

Los efectos de diversas dosis de midazolam sobre la exploración de los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de "+" se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Dunnett para determinar si algún grupo era diferente con respecto al grupo control.

Para evaluar los efectos de la tolerancia al primer ensayo, se compararon los efectos del midazolam en animales con una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de "+" con los efectos de la solución salina en animales con esta experiencia

previa. Cada grupo tratado con midazolam antes de la segunda experiencia fue comparado contra su grupo control. Se realizó una prueba de Mann Whitney de dos colas, con intervalos de confianza del 95% para comparar el tiempo que pasaron los animales en los brazos abiertos en la segunda experiencia (T2), cuando estos fueron tratados previamente con midazolam o cuando fueron tratados previamente con solución salina.

Para evaluar la cinética de la unión del [³H]flunitrazepam a los receptores GABA/benzodiazepinas en rebanadas de amígdala provenientes de animales sometidos en ausencia de fármacos al laberinto elevado en forma de "+", se realizaron pruebas de t no pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95% y corrección de Welch en las diferentes regiones cerebrales estudiadas, en el grupo de animales con una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de "+" comparados con los animales que no tuvieron esta experiencia.

En la región donde se mostró un cambio en la unión del [³H]flunitrazepam se calculó la constante de disociación (K_D) de la unión del [³H]flunitrazepam a su receptor en ratas sometidas al laberinto elevado en forma de "+", así como el número máximo de sitios de unión (B_{max}) para la unión del [³H]flunitrazepam en ratas libres de fármacos sometidas al laberinto elevado en forma de "+".

Las constantes de disociación y el número máximo de sitios de unión se compararon entre los grupos control y los animales que fueron sometidos al laberinto elevado en forma de "+". La comparación se realizó mediante pruebas de t no pareadas de dos colas con intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

Efecto de la manipulación farmacológica de receptores GABAérgicos con diferente composición de subunidades sobre la modulación amigdalina de la ansiedad.

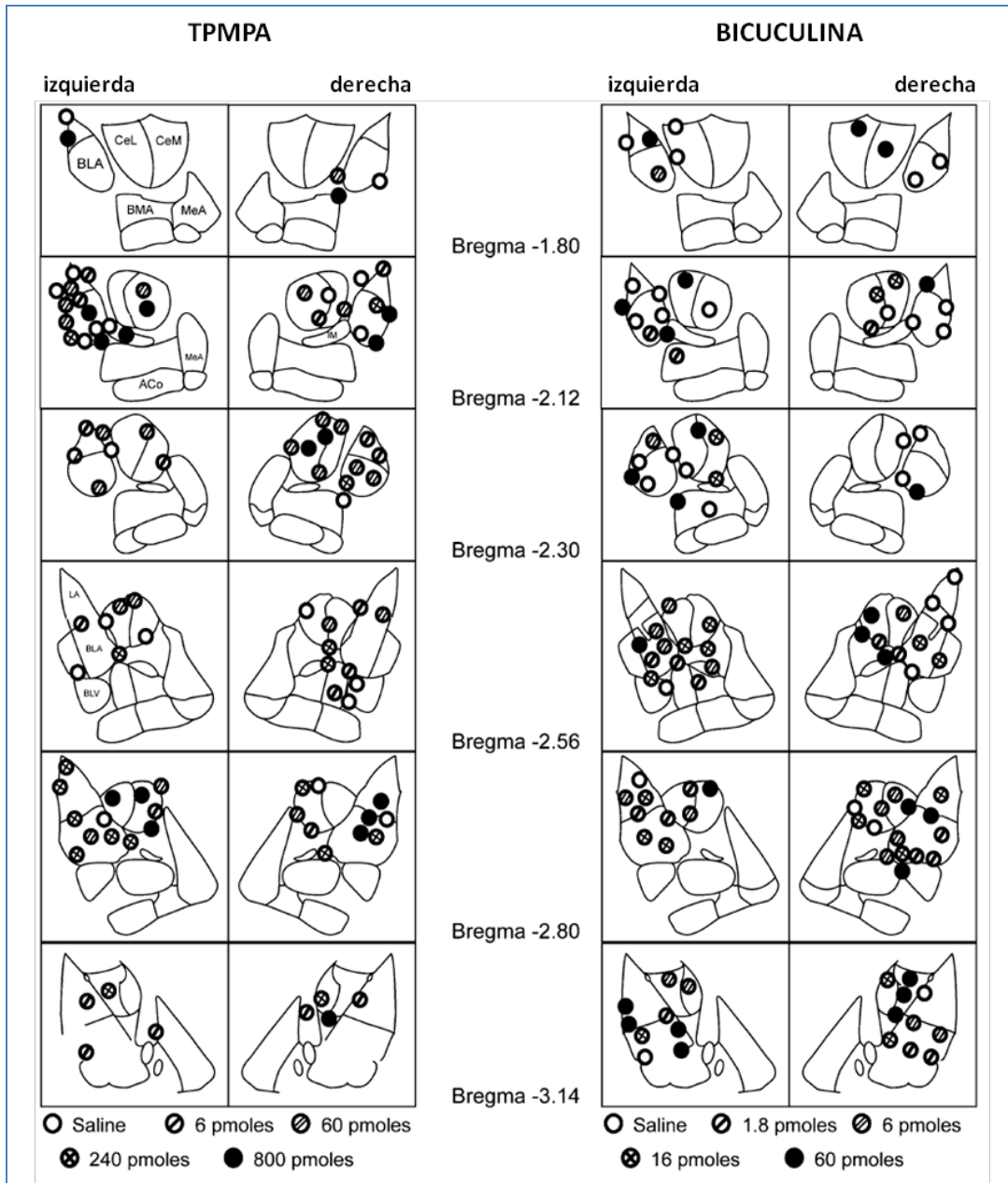
La localización de las puntas de las cánulas fue similar tanto en los animales tratados con TPMPA como en los animales tratados con bicuculina (Figura 5). A excepción de nueve animales, todos los demás usados en este experimento tuvieron las cánulas bilaterales colocadas en la amígdala rostral, entre -1.80mm y -3.14 mm del bregma, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). La punta de la mayoría de las cánulas estuvo colocada dentro del complejo basolateral (que comprende los núcleos lateral y basolateral) y el núcleo central de la amígdala. También estuvieron cerca de la isla intercalada principal y las islas paracapsulares mediales. En la posición más rostral (-1.40 a -1.80 mm del bregma) y caudal (-3.60 mm del bregma), las puntas de las cánulas se encontraron en una posición similar. No se encontraron puntas de cánulas en el núcleo medial ni en el núcleo cortical de la amígdala. La posición de las cánulas dentro de la amígdala de los animales destinados a estudiar el efecto del TPMPA sobre los niveles de corticosterona fue similar.

Efecto de la inhibición de los receptores GABA_A rho amigdalinos sobre la conducta de la rata en el laberinto elevado en forma de “+”.

La microinyección bilateral del TPMPA, un antagonista selectivo para los receptores GABA_A rho, redujo de manera significativa la exploración de los brazos abiertos del laberinto. Así, mientras a bajas dosis de TPMPA (6 pmol por lado) no se observaron efectos (Figura 6a), cuando se administraron dosis mayores (69 y 240 pmol por lado), se observó una reducción significativa en el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos del laberinto. No se observaron sin embargo efectos cuando el TPMPA se administró a dosis de 800 pmol por lado ($H_{4,47}=11.42$; $P<0.05$). De manera consistente con estos resultados, el tiempo que los animales pasaron en los brazos cerrados del laberinto aumentó de forma significativa ($H_{4,47}=11.4$) en aquellas dosis de TPMPA que fueron efectivas en disminuir la exploración de los brazos abiertos del laberinto (Figura 6b). De acuerdo con la reducción en el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos del laberinto, la microinyección bilateral de TPMPA mostró una tendencia a disminuir las entradas a los brazos abiertos (Figura 6c), sin embargo, en el análisis estadístico estas

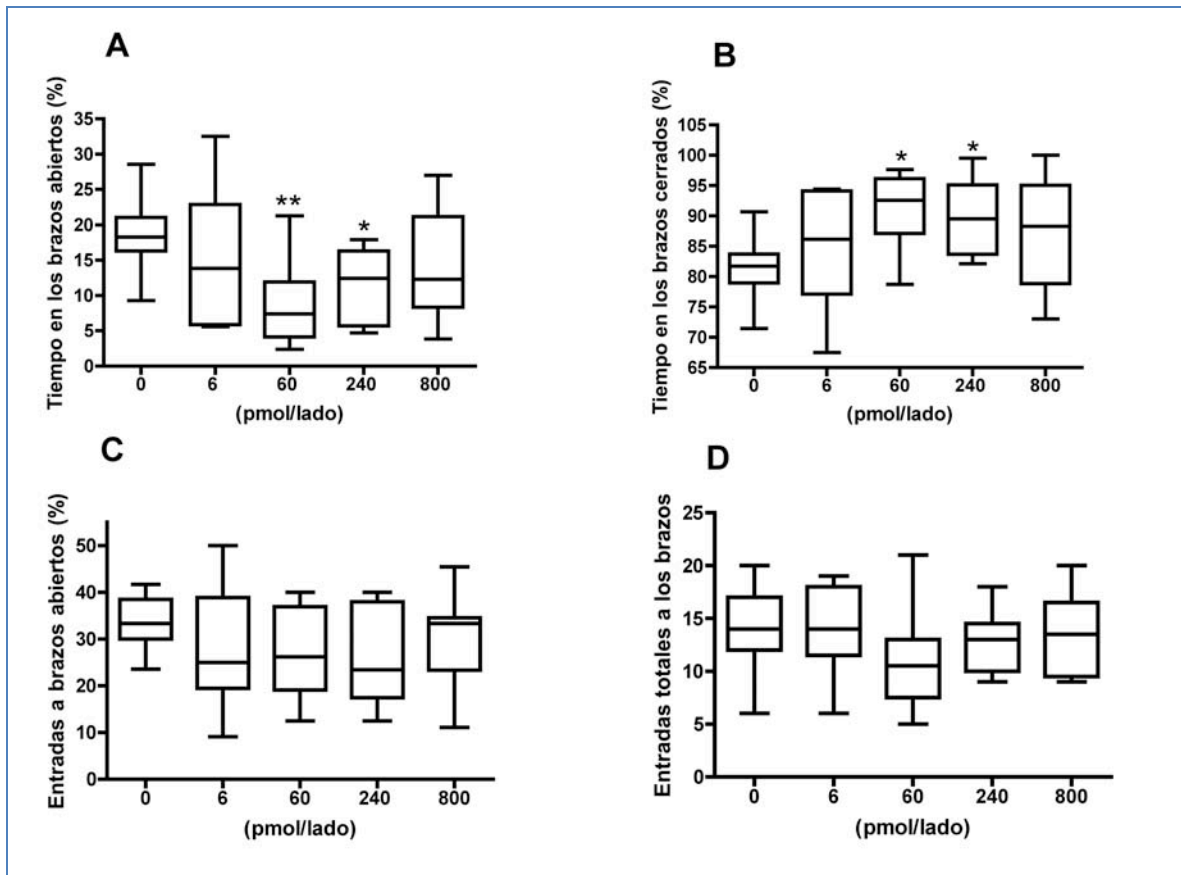
diferencias no fueron significativas ($H_{4,47}=2.772$; $P>0.05$). Adicionalmente no se encontró ningún cambio en el número de entradas a los brazos cerrados del laberinto en ninguna de las dosis de TPMPA usadas, ni en el número total de entradas a los brazos del laberinto (Figura 6d), calculadas como la suma del número de entradas a los brazos abiertos, mas el número de entradas a los brazos cerrados ($H_{4,47}=5.026$; $P>0.05$).

Figura 5: Representación esquemática de los sitios de implantación de cánulas.



ACo: Núcleo cortical amigdalino, BLA: núcleo basolateral; BMA: núcleo basomedial, CeL: núcleo central (división lateral); núcleo central (división medial), IM isla paracapsular intercalada, LA: amígdala lateral, MeA: núcleo medial.

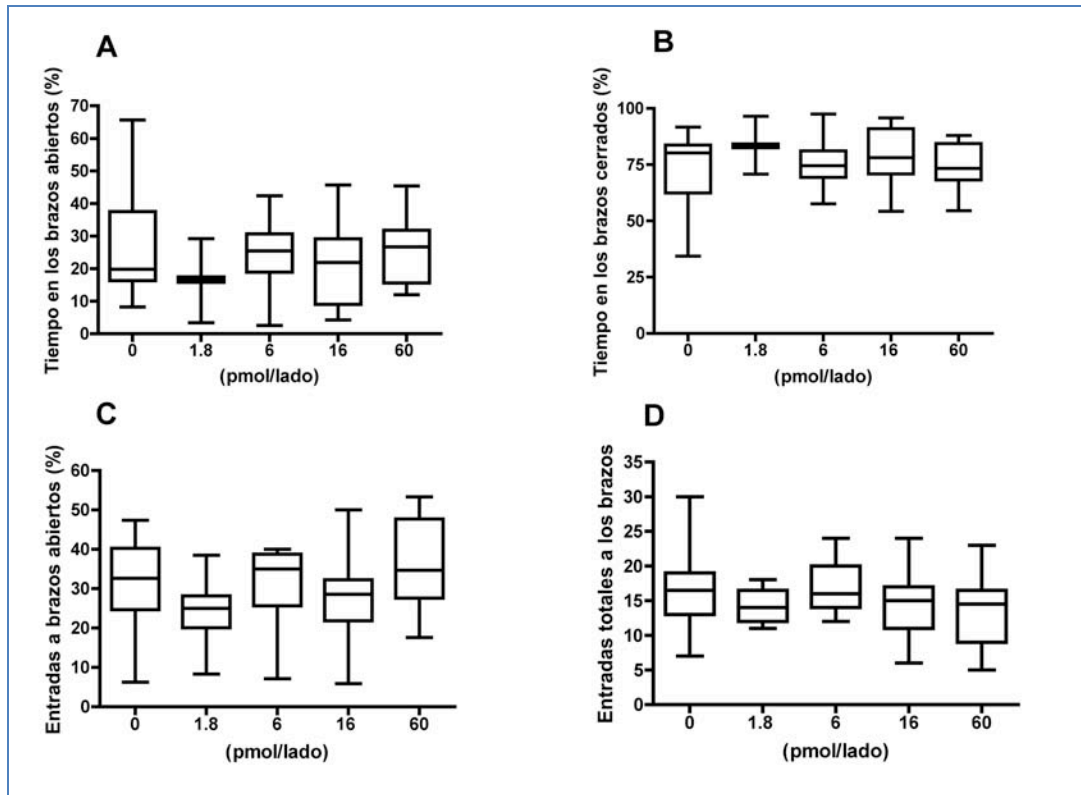
Figura 6: Efectos de la microinyección bilateral de TPMPA en la amígdala sobre el comportamiento de ratas en el laberinto elevado en forma de "+".



Los resultados están expresados en medianas con su respectivo rango intercuartil. Las barras indican los valores más altos y más bajos de la muestra. Las dosis más bajas de TPMPA (60-240 pmol/lado) disminuyen de forma significativa el tiempo que las ratas pasan en los brazos abiertos (a) y aumentan el tiempo en los brazos cerrados (b). La dosis más alta (800 pmol/lado) no tuvo efectos significativos. No hubo efectos estadísticamente significativos en las entradas a los brazos cerrados (c) o en el total de entradas en los brazos abiertos + cerrados (d). * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$ comparado con el control. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn. Control: $n=16$; 6 pmol TPMPA: $n=9$; 60 pmol TPMPA: $n=12$; 240 pmol TPMPA: $n=10$; 800 pmol de TPMPA: $n=10$.

La administración bilateral de bicuculina (1.8 – 60 pmol) no tuvo efectos (Figura 7) ni en el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos, ni en los brazos cerrados del laberinto. No se encontraron tampoco efectos de la bicuculina, en ninguna dosis administrada, en el número de entradas a los brazos abiertos o el número total de entradas a los brazos del laberinto, calculadas como la suma del número de entradas a los brazos abiertos, más el número de entradas a los brazos cerrados. Debido a la presencia de convulsiones después de la administración bilateral de la dosis de 60 pmol de bicuculina, no se administraron dosis mayores de dicho fármaco.

Figura 7: Efectos de la microinyección bilateral de bicuculina en la amígdala sobre el comportamiento de ratas en el laberinto elevado en forma de "+".

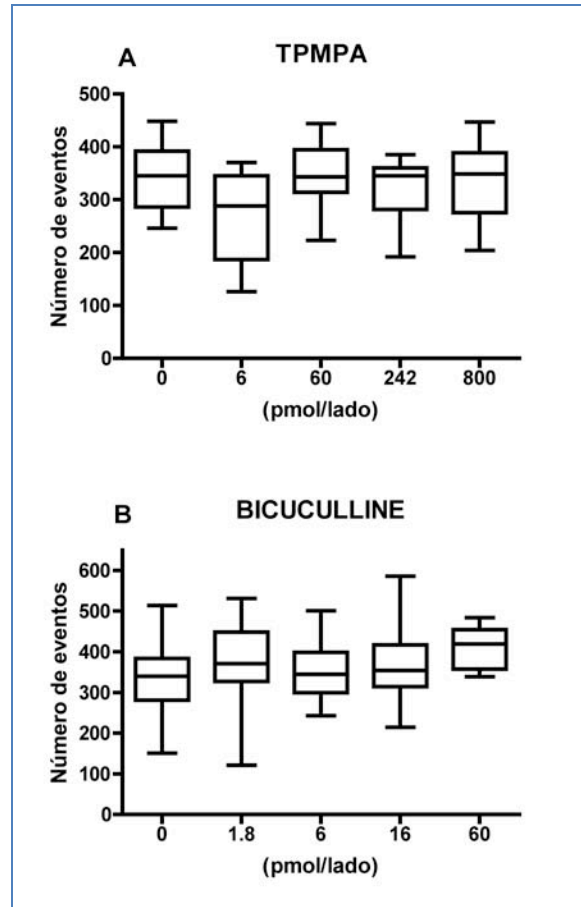


Los resultados están expresados en medianas con su respectivo rango intercuartil. Las barras indican los valores más altos y más bajos de la muestra. La bicuculina (1.8-60 pmol/lado) no tuvo efectos en el tiempo que las ratas pasan en los brazos abiertos (a) y el tiempo en los brazos cerrados (b). No hubo efectos estadísticamente significativos en las entradas a los brazos cerrados (c) o en el total de entradas en los brazos abiertos + cerrados del laberinto. (d). Prueba de Kruskal-Wallis >0.05 . Control: $n=19$; 1.8 pmol bicuculina: $n=9$; 6 pmol bicuculina: $n=9$; 16 pmol bicuculina: $n=13$; 60 pmol de bicuculina: $n=14$.

Campo abierto

Ni la administración bilateral de TPMPA o de bicuculina fueron capaces de afectar la locomoción de los animales cuando se probaron en el campo abierto (Figura 8).

Figura 8: Efectos de la microinyección bilateral de TPMPA y bicuculina en la locomoción de las ratas, medida en la prueba de campo abierto.

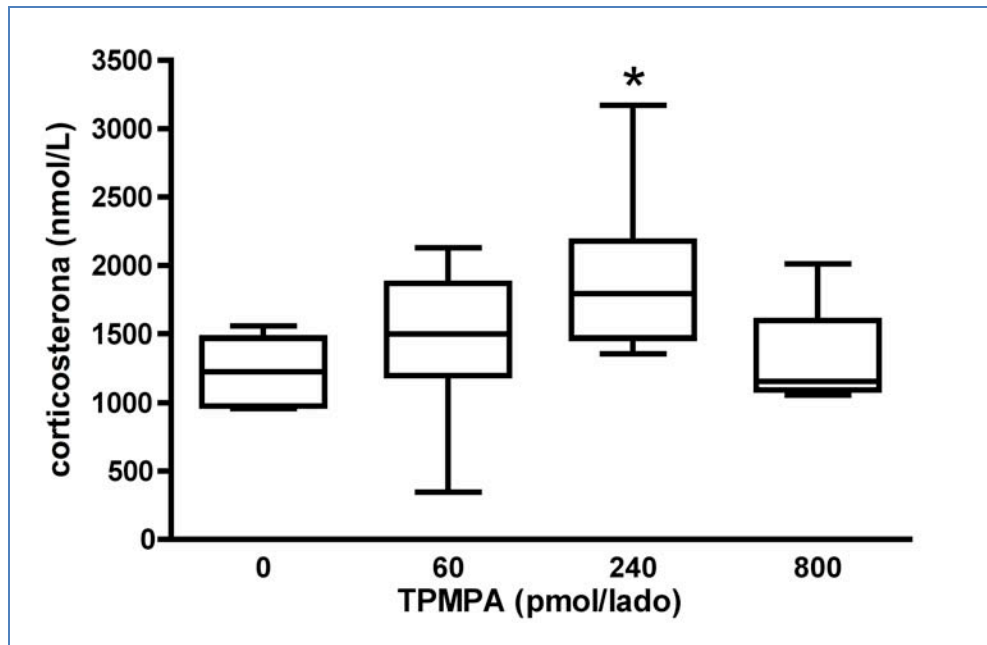


Los resultados están expresados en medianas con su respectivo rango intercuartil. Las barras indican los valores más altos y más bajos de la muestra. Ni la inyección de diferentes dosis de TPMPA (a) ni la inyección de diferentes dosis de bicuculina (b) tuvieron efectos sobre la locomoción de las ratas. Prueba de Kruskal-Wallis >0.05 . TPMPA control: $n=11$; 6 pmol TPMPA: $n=9$; 60 pmol TPMPA: $n=12$; 240 pmol TPMPA: $n=10$; 800 pmol de TPMPA: $n=10$. Bicuculina control: $n=19$; 1.8 pmol bicuculina: $n=9$; 6 pmol bicuculina: $n=9$; 16 pmol bicuculina: $n=13$; 60 pmol de bicuculina: $n=14$.

Niveles de corticosterona en el plasma

Para validar el efecto ansiogénico observado, se midieron los niveles de corticosterona en diferentes grupos de ratas 15 minutos después de la microinyección bilateral de TPMPA en la amígdala (60 – 800 pmol por lado). De manera consistente con los efectos de este antagonista en el laberinto elevado en forma de "+", los niveles de corticosterona en el plasma aumentaron de manera dosis-dependiente a las dosis bajas pero sus efectos desaparecieron cuando el TPMPA fue administrado a la dosis de 800 pmol por lado (Figura 9).

Figura 9: Efectos de la microinyección bilateral de TPMPA en la amígdala de ratas sobre los niveles de corticosterona en el plasma



Los resultados están expresados en medianas con su respectivo rango intercuartil. Las barras indican los valores más altos y más bajos de la muestra. Las dosis bajas de TPMPA incrementan los niveles de corticosterona en el plasma, pero no tiene efectos en la dosis más alta utilizada. * $P < 0.05$ comparado con el control. Prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn. Control: $n=5$; 60 pmol de TPMPA: $n=8$; 240 pmol de TPMPA: $n=10$; 8000 pmol de TPMPA: $n=4$.

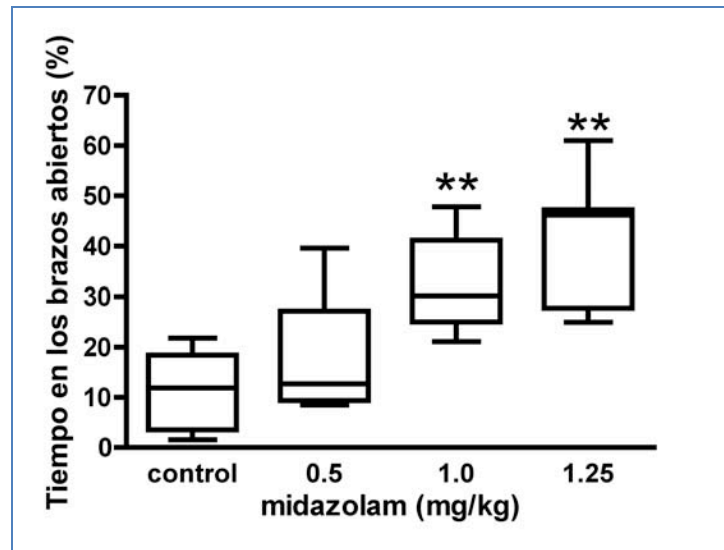
Análisis temporal del fenómeno de la tolerancia al primer ensayo.

Como se señaló anteriormente, los cambios estructurales conllevan a cambios cinéticos en el receptor GABAA, existe la posibilidad de que dichos cambios cinéticos en pudieran estar involucrados en la respuesta de los roedores a condiciones experimentales específicas tales como aquellas que ocurren en el fenómeno de la tolerancia al primer ensayo.

Para tal objeto, y sabiendo que el midazolam es una benzodiazepina hidrosoluble, se realizó una curva dosis-respuesta para conocer la dosis óptima de este compuesto con la que los efectos ansiolíticos coexistan con un mínimo de efectos motores. De esta forma, cuando los animales fueron inyectados intraperitonealmente con diferentes dosis de midazolam (0.5, 1.0 y 1.25mg/kg), se encontró un aumento significativo en el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos del laberinto ($P < 0.01$, ANOVA de una vía ($F=21.08$)). Como puede observarse en la Figura 10, de acuerdo a la prueba de Dunnett que fue usada como prueba post hoc, sólo las dosis más altas de midazolam

(1.0 y 1.25 mg/kg) tuvieron resultados estadísticamente significativos ($P < 0.01$) cuando se compararon contra su control, optándose por usar la dosis de 1.25 mg/kg para los experimentos de tolerancia al primer ensayo.

Figura 10: Efectos de la inyección intraperitoneal de midazolam en el comportamiento de las ratas en el laberinto elevado en forma de "+".



Los resultados están expresados en medianas con su respectivo rango intercuartil. Las barras indican los valores más altos y más bajos de la muestra. La inyección de midazolam en las 3 dosis usadas (0.5, 1.0 y 1.25 mg/kg) aumentan de forma significativa el tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de "+". Solo las dosis de 1.0 y 1.25 mg/kg fueron estadísticamente significativas. $**P < 0.01$. ANOVA de una vía ($F=21.08$) seguida de una comparación múltiple de Dunnett. Control: $n=15$, 0.5 mg/kg de midazolam: $n=6$, 1.0 mg/kg de midazolam: $n=7$, 1.25 mg/kg de midazolam: $n=7$.

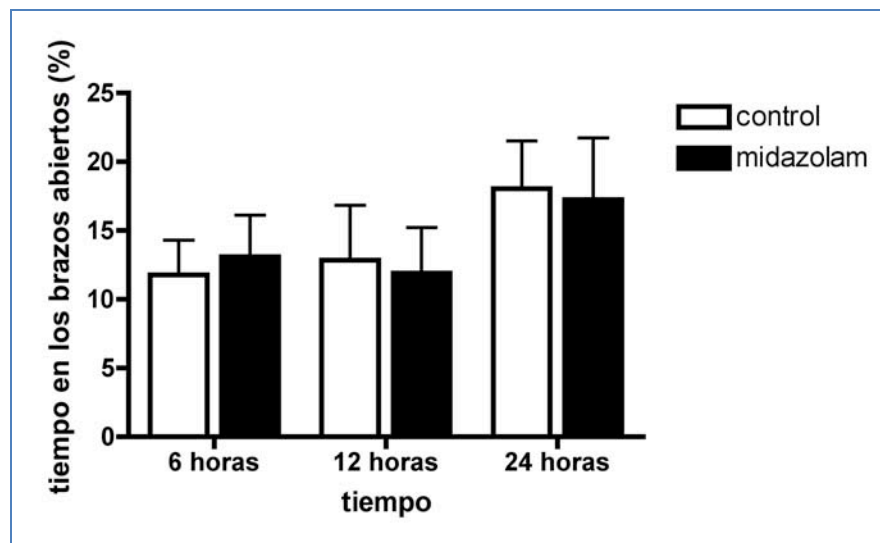
Efectos del midazolam en animales con una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de "+".

Como era de esperarse, la inyección intraperitoneal de 1.25 mg/kg de midazolam tuvo efectos ansiolíticos en el laberinto elevado en forma de "+" cuando se comparó con animales inyectados intraperitonealmente con solución salina (NaCl 0.9%). La inyección intraperitoneal del vehículo (NaCl 0.9%) y del midazolam se realizó 30 minutos antes de que los animales fueran sometidos al laberinto. Los efectos ansiolíticos del midazolam pueden observarse en el tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos del laberinto tras la administración de este fármaco. Este aumento en el tiempo fue estadísticamente significativo ($P < 0.01$) y se interpreta como la disminución de ansiedad en los animales.

Sin embargo, cuando se inyectó midazolam a diferentes tiempos (6, 12 y 24 horas) después de su primera experiencia libre de fármaco en el laberinto (T1), no se observaron efectos a ninguno de los tiempos analizados. Prueba de Mann Whitney de dos colas con intervalos de confianza del 95%. ($U_6=27$, $U_{12}=18$, $U_{24}=29$).

Con la falta de cambios presentados en el tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos del laberinto elevado en forma de más, podemos decir que el midazolam pierde los efectos ansiolíticos cuando es inyectado intraperitonealmente en animales que han experimentado una primera experiencia el laberinto elevado en forma de "+" sin ningún fármaco (T1) en las 6, 12 o 24 horas previas a la inyección (Figura 11).

Figura 11: Efectos del midazolam en el laberinto elevado en forma de "+" en animales con una experiencia previa libre de fármacos en el mismo laberinto.



Los resultados están expresados en medias \pm el error estándar de la media. Las barras corresponden al promedio del porcentaje del tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos en la segunda prueba (T2). No se encontró diferencia en el tiempo que los animales pasaron en los brazos abiertos, sin importar si en la segunda prueba fueron inyectados con solución salina o con midazolam. Prueba de Mann Whitney de dos colas con intervalos de confianza del 95%. ($U_6=27$, $U_{12}=18$, $U_{24}=29$). Control 6: n=7, Midazolam 6: n=8, Control 12: n=6, Midazolam 12: n=6, Control 24: n=10, Midazolam 24: n=6.

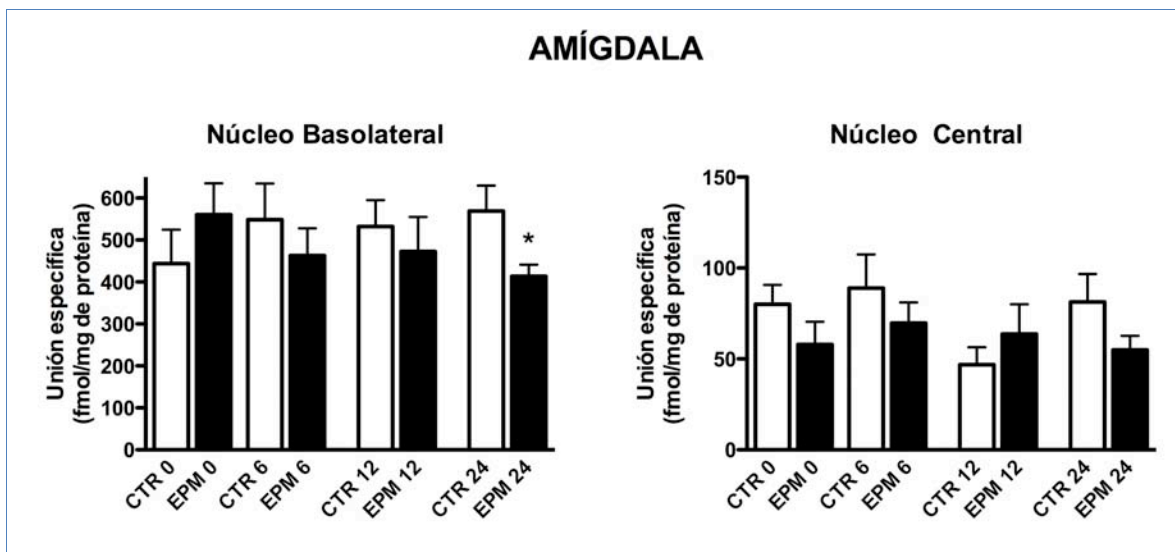
Cinética de la unión del [3 H]flunitrazepam a los receptores GABA/benzodiacepinas en rebanadas de amígdala provenientes de animales sometidos en ausencia de fármacos al laberinto elevado en forma de "+".

Con el objeto de indagar si los efectos de la exposición previa al laberinto elevado en forma de "+" de animales no tratados era capaz de modificar las características cinéticas del receptor GABA/benzodiacepina en la amígdala, secciones coronales de

cerebro (20 μ m) conteniendo a la amígdala y al hipocampo fueron incubadas con 2.5 nmol de [3 H] flunitrazepam. Y procesadas como se señaló en la sección de Métodos

La autorradiografía demostró que existe una disminución estadísticamente significativa en la unión del [3 H] flunitrazepam a sus receptores en el núcleo basolateral de la amígdala; en animales que 24 horas antes tuvieron una experiencia en el laberinto elevado en forma de "+" libre de todo tratamiento farmacológico (Figura 12).

Figura 12: Unión de [3 H]flunitrazepam en la amígdala de la rata tras una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de "+" sin ningún fármaco.

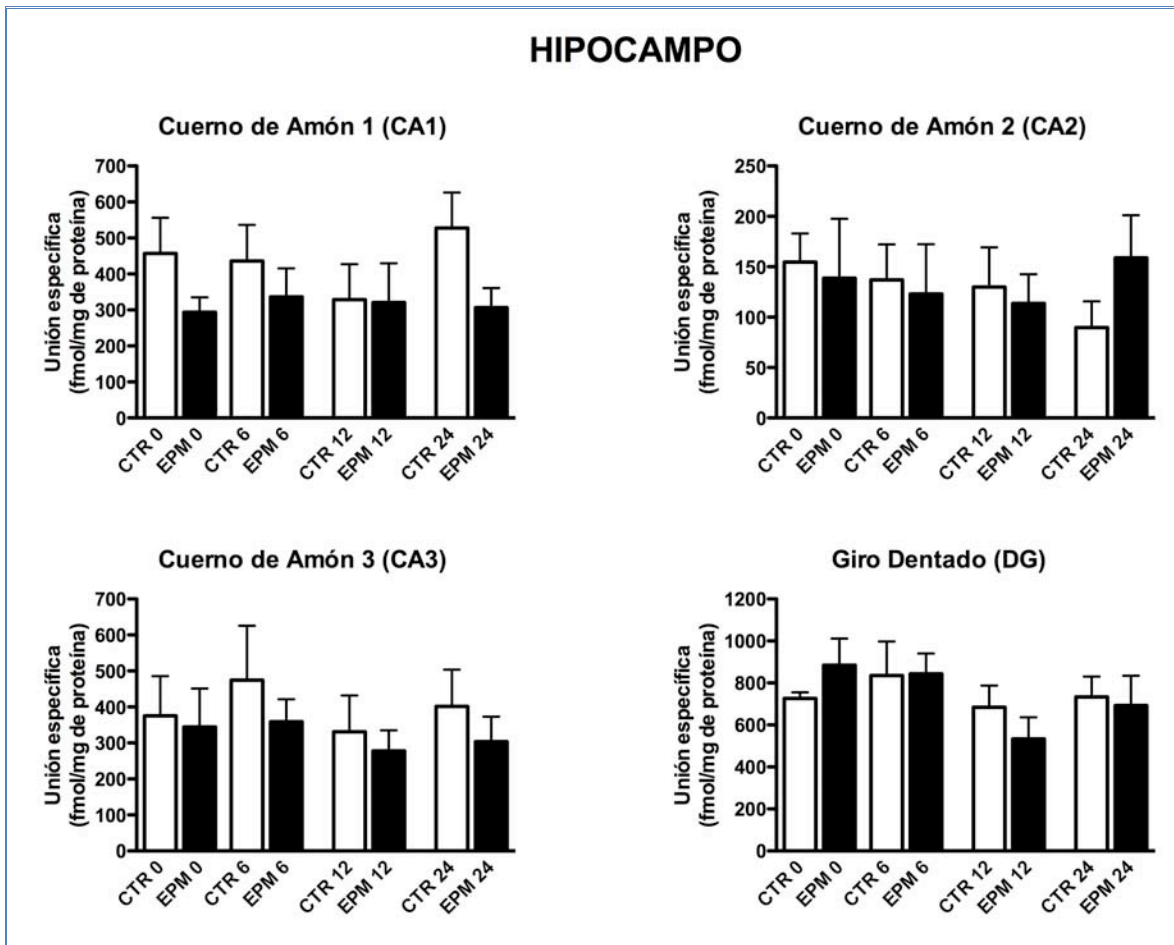


Los resultados están expresados como medias \pm su error estándar. Las barras corresponden al promedio de la unión específica del flunitrazepam (fmol/mg de proteína) en el núcleo basolateral (izquierda) y el núcleo central (derecha) de la amígdala de ratas que tuvieron una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de "+" sin ningún fármaco. Prueba de t no pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95% y corrección de Welch. * $P < 0.05$. CTR 24: $n = 22$, EPM 24: $n = 12$, CTR 12: $n = 15$, EPM 12: $n = 12$, CTR 6: $n = 14$, EPM 6: $n = 16$, CTR 0: $n = 10$, EPM 0: $n = 15$.

Aunque esta disminución se observa ya desde las 6 y 12 horas después de la exposición de los animales al laberinto, muy probablemente debido a la amplia variabilidad experimental observada, los cambios únicamente alcanzaron significancia estadística en aquel grupo de ratas al que se le aplicó la autorradiografía a las 24 horas después de su exposición al laberinto. Alternativamente, la falta de efectos claros observada en la unión del [3 H]flunitrazepam observada al inicio de estos experimentos podría indicar la operación de efectos plásticos lentos tendientes a estabilizar la falta de respuesta de los receptores GABA_A convencionales a las benzodiazepinas. Es claro que nuevos estudios tendientes a demostrar la persistencia de este fenómeno después de las 24 horas serán necesarios para aceptar esta hipótesis.

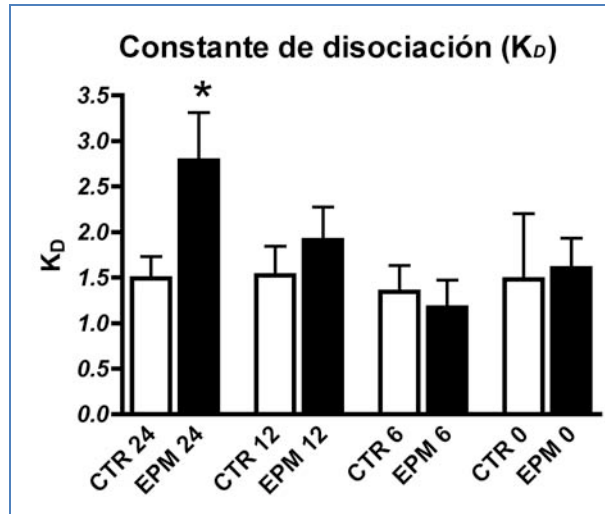
En contra de lo observado en el núcleo basolateral, no se detectaron cambios en la unión del $[^3\text{H}]$ flunitrazepam en el núcleo central (Figura 12) en ninguno de los grupos estudiados. Ningún cambio fue tampoco observado sobre la unión de $[^3\text{H}]$ flunitrazepam a sus receptores en el hipocampo de los diferentes grupos de ratas expuestas al laberinto (Figura 13).

Figura 13: Unión de $[^3\text{H}]$ flunitrazepam en el hipocampo de la rata tras su exposición libre de fármacos al laberinto elevado en forma de "+"



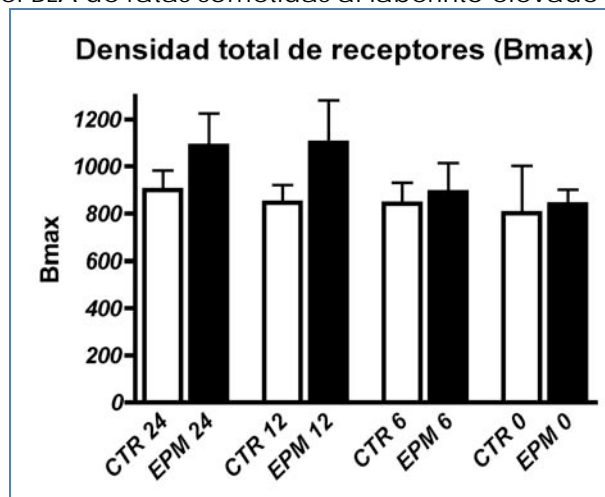
Los resultados están expresados en medias \pm el error estándar de su media. Las barras corresponden al promedio de la unión específica del flunitrazepam (fmol/mg de proteína) en diferentes regiones del hipocampo de ratas que tuvieron una experiencia previa sin ningún fármaco en el laberinto elevado en forma de "+". Prueba de t no pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95% y corrección de Welch. CTR 24: n=22, EPM 24: n=12, CTR 12: n=15, EPM 12: n=12, CTR 6: n=14, EPM 6: n=16, CTR 0: n=10, EPM 0: n=15.

Figura 14: Constante de disociación (K_D) de la unión del [3 H]flunitrazepam a su receptor en el BLA de ratas sometidas al laberinto elevado en forma de "+".



Los resultados están expresados en medias \pm el error estándar de su media. Las barras corresponden al promedio de la constante de disociación (K_D) en cada uno de los grupos de animales sometidos a diferentes tiempos al laberinto elevado en forma de "+". Prueba de t no pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95% y corrección de Welch. CTR 24: n=14, EPM 24: n=12, CTR 12: n=16, EPM 12: n=14, CTR 6: n=14, EPM 6: n=14, CTR 0: n=16, EPM 0: n=16.

Figura 15: Número de receptores (B_{max}) que participan en la unión del [3 H]flunitrazepam a su receptor en el BLA de ratas sometidas al laberinto elevado en forma de "+".



Los resultados están expresados en medias \pm el error estándar de su media. Las barras corresponden al promedio del número máximo de sitios de unión (B_{max}) en cada uno de los grupos de animales sometidos a diferentes tiempos al laberinto elevado en forma de "+". Prueba de t no pareada de dos colas con intervalos de confianza del 95% y corrección de Welch. CTR 24: n=14, EMP 24: n=12, CTR 12: n=16, EMP 12: n=14, CTR 6: n=14, EMP 6: n=14, CTR 0: n=16, EMP 0: n=16.

Con el objeto de indagar la naturaleza del cambio observado sobre la unión del [³H]flunitrazepam en el BLA de ratas no tratadas y expuestas con 24 horas de anterioridad al laberinto elevado en forma de "+" se obtuvieron los valores de la constante de disociación (K_D) (Figura 14) y de la unión total (B_{max}) a su receptor (Figura 15).

Los valores de la constante de disociación (K_D) encontrados en los experimentos autorradiográficos mostraron que la K_D no presenta cambios de forma inmediata en aquellos animales que fueron sometidos, en ausencia de fármacos, al laberinto elevado en forma de "+" y que es solo hasta las 24 horas de su exposición cuando se observa un aumento significativo en los valores de esta constante. Cabe señalar, sin embargo, que el inicio en el incremento de la K_D se esboza ya desde a 12 horas posteriores a la exposición de las animales al laberinto.

El análisis de los valores encontrados para el número de receptores que participan en la unión del [³H] flunitrazepam al receptor GABA/benzodiazepinas (B_{max}) no mostró cambio, sin importar el tiempo previo en que los animales fueron sometidos al laberinto elevado en forma de "+".

DISCUSIÓN

La participación de un determinado sistema de neurotransmisión en el funcionamiento del sistema nervioso central depende dentro de otros factores de la conectividad de sus neuronas y de la naturaleza y características funcionales de sus receptores. Es comúnmente aceptado que el sistema GABAérgico juega un papel fundamental en prácticamente todas las manifestaciones funcionales del sistema nervioso central de los mamíferos y que sus acciones son mediadas por la unión del GABA tanto a receptores ionotrópicos como metabotrópicos. La mayoría de los receptores ionotrópicos, conocidos como GABA_A, forman canales iónicos constituidos por la asociación heteromérica de distintos tipos de subunidades denominadas alfa (α), beta (β), gamma (γ) y delta (δ). Los receptores GABA_A rho son canales asociados a ligando que difieren estructuralmente del resto de los receptores GABA_A por estar constituidos por ensamblajes homoméricos de subunidades rho (Chebib, 2004; Cutting et al, 1991; Enz et al, 1995; Enz y Cutting, 1998; Greka et al, 2000; Olsen y Sieghart, 2008; Wang et al, 1994) y muy probablemente, también por ensamblajes heteroméricos formados por la asociación de subunidades rho con otras subunidades del receptor GABA_A, tales como la subunidad γ 2 (Milligan et al, 2004; Pan y Qian, 2005). Así, como consecuencia de su muy particular estructura cuaternaria, los receptores GABA_A rho poseen un perfil farmacológico distintivo (Chebib, 2004; Drew et al, 1984; Drew y Johnston, 1992; Feigenspan et al, 1993; Olsen y Sieghart, 2008; Polenzani et al, 1991; Ragozzino et al, 1996; Wang et al, 1994) y poseen propiedades fisiológicas sui generis (Bormann y Feigenspan, 1995; Feigenspan y Bormann 1994; Feigenspan et al, 1993; Polenzani et al, 1991; Qian y Dowling, 1993; Wang et al, 1994; Woodward et al, 1992).

En este trabajo se presenta por primera vez evidencia experimental que señala la importancia de las subunidades rho en la estructuración de receptores GABA_A, con trascendencia en la modulación amigdalina de la ansiedad y el comportamiento cinético de la plasticidad de los receptores GABA_A, ante la presencia de estímulos ansiogénicos innatos como la exposición a espacios abiertos carentes de indicios tigmotácticos, como ocurre en el laberinto elevado en forma de "+".

Papel de receptores GABA_A rho en la modulación amigdalina de la ansiedad.

Las principales observaciones a este respecto son que la microinyección bilateral de TPMPA, un antagonista selectivo del receptor GABA_A rho (Ragozzino *et al*, 1996), dentro de la amígdala rostral de la rata, disminuye la exploración del laberinto elevado en forma de "+" y aumenta los niveles de corticosterona en el plasma de estos animales.

En estos experimentos, la microinyección bilateral de TPMPA (60-240 pmol/lado) disminuye el tiempo que las ratas pasan en los brazos abiertos del laberinto. Estos efectos no fueron observados con la dosis mas baja (6 pmol/lado), y a pesar de la considerable disminución en la exploración de los brazos abiertos, los resultados no fueron estadísticamente significativos cuando la dosis más alta de TPMPA (800 pmol/lado) fue usada. De forma consistente con estos resultados, la microinyección bilateral de TPMPA induce una tendencia a la reducción en el número de entradas a los brazos abiertos del laberinto e incrementa de forma significativa el tiempo que las ratas pasan en estos brazos del laberinto.

El laberinto elevado en forma de "+" es una prueba no condicionada de ansiedad que evalúa el miedo y/o la ansiedad innatas (Pellow *et al*, 1985; Rodgers, 1997), explotando el miedo natural de los roedores a los espacios abiertos (Treit *et al*, 1993). De esta forma, la reducción en la exploración de los brazos abiertos del laberinto y, como consecuencia de ello, el aumento en el tiempo que las ratas pasan en los brazos cerrados del laberinto, sugiere que el bloqueo de los receptores GABA_A rho en la amígdala rostral de la rata resulta en la inducción de una respuesta ansiogénica.

Estas observaciones están de acuerdo con la disminución en la exploración de los brazos abiertos observada en ratas criadas con altos niveles de ansiedad (Henninger *et al*, 2000) o en experimentos llevados a cabo en ratas tratadas con compuestos ansiogénicos (Pellow *et al*, 1985; Davis y Whalen 2001; Pérez de la Mora *et al*, 2008; Pérez de la Mora *et al*, 2010; Engin y Treit, 2008). Por otro lado, los efectos de la microinyección bilateral de TPMPA en la amígdala sobre la exploración de los brazos abiertos del laberinto no parecen ser ocasionados por cambios en la actividad general de las ratas, como lo muestra la falta de efectos del TPMPA en el número total de entradas a los brazos abiertos y cerrados del laberinto, que es una medida de locomoción en los animales (Pellow *et al*, 1985), así como en la motilidad en el campo abierto.

De forma consistente con los resultados de las pruebas conductuales, los niveles de corticosterona en el plasma, que se ha demostrado aumentan bajo condiciones estresantes o ansiogénicas (File et al, 1994; Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008; Muñoz-Abellán et al, 2010; Stephens et al, 1987), se incrementaron después de la microinyección de dosis bajas de TPMPA en la amígdala (60-240 pmol/lado), pero no cuando este compuesto se inyectó a dosis altas (800 pmol/lado).

Cabe señalar, que estos resultados varían con los encontrados por Cuhna y sus colaboradores (Cuhna et al, 2010), quienes reportaron que la infusión de una dosis elevada de TPMPA (30 nmol) dentro del núcleo lateral de la amígdala disminuye el congelamiento de las ratas en la prueba condicionada de dicho nombre, sugiriendo que el bloqueo de los receptores GABA_A rho interfiere con el aprendizaje del miedo. Estas diferencias no son del todo claras, ya que los paradigmas utilizados son diferentes y en ellas pueden estar involucrados otros factores tales como el sitio de inyección del TPMPA, así como la magnitud de la dosis usada. Así, cabe señalar al respecto, que en los experimentos del grupo de Cuhna, la administración del TPMPA fue restringida al núcleo lateral de la amígdala, mientras que en nuestros experimentos el antagonista se inyectó en una región cercana a las islas intercaladas mediales y al núcleo central de la amígdala. En este aspecto, es significativo que en rebanadas de amígdala incubadas con TPMPA, la inhibición evocada en el CeA por la estimulación de las islas intercaladas paracapsulares se incrementó (Delaney y Sah, 2001), mientras que en los experimentos de Cuhna (Cuhna et al, 2010), se disminuye la inhibición y aumenta la excitación evocada por la estimulación de la cápsula interna y externa. Por otro lado, mientras que en nuestros experimentos el TPMPA fue microinyectado dentro del rango picomolar (6 - 800 pmol/lado) y los resultados no fueron significativos cuando se usó la dosis mas alta, en los experimentos de Cuhna el TPMPA fue administrado dentro de un rango nanomolar (30 nmol).

La razón por cual se perdieron los efectos del TPMPA cuando se administró la dosis más alta, tanto en la exploración del laberinto elevado en forma de "+" como en los niveles de corticosterona en el plasma, no está clara; pero un efecto de "tope máximo" pudo haber contribuido a la falta de resultados estadísticamente significativos que se observaron en este trabajo. En apoyo a esta explicación, se ha reportado que los efectos del TPMPA en la formación de memoria a largo plazo en pollos es máxima a 300 pmol por hemisferio pero que los efectos desaparecen cuando se administra una dosis más alta de este compuesto (Gibbs y Johnston, 2005). Estudios recientes han mostrado que la salida

ansiogénica de la amígdala se encuentra bajo el control de neuronas GABAérgicas pertenecientes a las islas paracapsulares ventrales, y que existen interacciones inhibitorias seriales mediadas por receptores GABA_A tradicionales a través de las cuales las islas paracapsulares dorsales inhiben a las ventrales con la consiguiente producción de ansiedad (Paré et al, 2004; Pérez de la Mora et al, 2008; Pérez de la Mora et al, 2010). En vista de lo anterior y debido a la cercanía de los sitios de inyección del TPMPA con la cadena de islas intercaladas paracapsulares, el aumento en la dosis del TPMPA podría haber resultado en una pérdida de su selectividad por los receptores GABA_A rho y en un bloqueo de los receptores GABA_A tradicionales que controlan la interacción entre las islas paracapsulares dorsales y ventrales, con la consiguiente producción de efectos ansiolíticos antagónicos que podría haber llevado a la pérdida de los efectos ansiogénicos observados en nuestros experimentos. Finalmente, dado que en los experimentos de Cuhna, las dosis más altas de TPMPA causaron efectos ansiolíticos atribuidos al bloqueo de los autoreceptores GABA_A rho, es posible que en nuestros experimentos el TPMPA administrado en la dosis más alta hubiera actuado tanto sobre receptores GABA_A rho postsinápticos como presinápticos, conduciendo a una mezcla antagónica de efectos tanto ansiogénicos como ansiolíticos.

En contraste a los resultados con TPMPA, la microinyección bilateral de bicuculina dentro de la amígdala en un rango de 1.8 a 60 pmol por lado, no afectó la exploración del laberinto elevado en forma de "+". Desafortunadamente, la presencia de convulsiones después de la microinyección bilateral de 60 pmol por lado de bicuculina impidió la administración de dosis más altas de este antagonista. Como en el caso de la administración del TPMPA, la microinyección bilateral de bicuculina no tuvo efectos en la actividad general de las ratas tratadas. Nuestros resultados están de acuerdo con los resultados de Rezayat y sus colaboradores (Rezayat et al, 2005), quienes después de la microinyección de altas dosis de bicuculina (2,000 a 8,000 pmol por lado) dentro del hipocampo dorsal de ratas, no encontraron efectos en el laberinto elevado en forma de "+", así como con los resultados de Zarrindast y sus colaboradores (Zarrindast et al, 2001), quienes tampoco encontraron efectos en el laberinto elevado en forma de "+" después de administrar bicuculina de forma intracerebroventricular. Nuestros resultados, sin embargo, varían de los resultados encontrados por Sajdyk y Shekhar (Sajdyk y Shekhar, 1997), quienes encontraron efectos ansiogénicos en la prueba de interacción social después de la administración de 20 pmol por lado de bicuculina, así como un aumento en la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, cuando la bicuculina fue administrada en el núcleo basolateral de la amígdala. Como los efectos de la microinyección bilateral del

TPMPA y de la bicuculina encontrados en nuestros experimentos difieren uno de otro de forma cualitativa, es improbable que los efectos del TPMPA sobre el miedo y la ansiedad reportados en este trabajo sean resultado de efectos inespecíficos de este compuesto sobre los receptores GABA_A convencionales. Por el contrario, nuestros resultados indican que los receptores GABA_A rho que se encuentran en la amígdala poseen un claro papel en la modulación del miedo y la ansiedad.

Es significativo que, mientras en algunas ratas se generaron convulsiones después de la microinyección bilateral de dosis bajas (60 pmol por lado) de bicuculina (Turski *et al*, 1985), ninguna de las ratas desarrolló actividad convulsiva hasta 800 pmol por lado de TPMPA. De acuerdo con nuestros resultados, los estudios de Takechi (Takechi *et al*, 2009) mostraron que la administración intracerebroventricular de 5 µg de TPMPA a ratones no indujo actividad convulsiva, pero se presentaron convulsiones cuando la dosis de TPMPA se incrementó al doble. Es posible que tanto en estos experimentos como en los nuestros la selectividad de este antagonista se haya perdido y las convulsiones hayan resultado como consecuencia de la inhibición de receptores GABA_A convencionales.

El sitio de la amígdala responsable de los efectos del TPMPA sobre el miedo y la ansiedad observados en este estudio se desconocen. Sin embargo, bajo las condiciones de microinyección usadas en este trabajo, se ha demostrado que [³H]2-methyl-6(feniletinil) piridina, un compuesto con un peso molecular similar al del TPMPA, no difunde dentro de la amígdala más allá del espacio ocupado por una esfera de 1 mm³ de volumen centrada en el sitio de su inyección (Pérez de la Mora *et al*, 2006). En vista de lo anterior es posible que el TPMPA hubiese actuado en la amígdala cerca de su sitio de inyección, principalmente el núcleo central, el complejo basolateral, y las islas paracapsulares intercaladas mediales (Esmaeili *et al*, 2009).

Estudios recientes han mostrado que la activación de los receptores GABA_A rho pueden ejercer efectos tónicos inhibitorios, a diferencia de los receptores GABA_A convencionales, ya que poseen una tasa de desensibilización muy baja (Polenzani *et al*, 1991; Qian y Dowling, 1993) y el tiempo de apertura de su canal es mayor que para los receptores GABA_A sensibles a la bicuculina (Feigenspan y Bormann 1994; Feigenspan *et al*, 1993). Por otro lado, dado que se han encontrado corrientes insensibles a la bicuculina, pero sensibles al TPMPA, en el núcleo central de la amígdala después de la aplicación ionofóretica de GABA o de la estimulación eléctrica de las islas intercaladas mediales (Delaney y Sah, 1999; Delaney y Sah, 2001) es posible que la administración de bajas dosis

de TPMPA hayan producido sus efectos ansiogénicos a través del bloqueo de receptores inhibitorios GABA_A rho, tónicamente activos en las neuronas ansiogénicas de proyección localizadas en el núcleo central de la amígdala.

De manera alternativa, el TPMPA pudo haber actuado a nivel del núcleo basolateral mediante la desinhibición de grupos cruciales de neuronas piramidales de proyección mantenidas en "jaque" por neuronas GABAérgicas activadas por la corteza prefrontal medial (Marowski et al, 2005) o de un modo complejo a través de efectos sobre la cadena de interacciones GABA-GABA que, como se señaló antes, ocurren al nivel de las islas intercaladas (Royer et al, 1999; Royer et al, 2000; Paré et al, 2004), o bien dentro de la división lateral del núcleo central (Sun et al, 1994). Las acciones combinadas del TPMPA sobre estos sitios deberán ser exploradas para dar una la explicación más coherente a las acciones ansiogénicas del TPMPA.

Finalmente, ya que las dosis de TPMPA que disminuyeron la exploración en el laberinto elevado en forma de "+", aumentaron también los niveles de corticosterona en el plasma, y ha sido demostrado que el núcleo central de la amígdala está implicado en la modulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (Herman et al, 2005; Jankord y Herman, 2008), es posible que ambos efectos hayan sido mediados vía un mecanismo común que involucra la actividad del receptor GABA_A rho dentro del núcleo central de la amígdala.

En apoyo de esta sugerencia cabe señalar que las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo, responsables de la activación del eje hipotálamo-hipofisis adrenal se encuentran sujetas a un fuerte control inhibitorio proveniente de diversas estructuras tales como los núcleos cama de la estria terminal, dorsomedial del hipotálamo, del tracto solitario y del área preòptica y que a su vez estos núcleos son inhibidos por neuronas GABAérgicas provenientes del núcleo central de la amígdala (Jankord y Herman, 2008). En vista de lo anterior es concebible que la remoción de este control inhibitorio inducido por el bloqueo de receptores GABA rho en su núcleo central haya resultado en una activación de las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo con la consiguiente activación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal y la consecuente liberación de corticosterona. Cabe señalar por otro lado que la liberación de corticosterona más que ser una consecuencia de el estado ansioso promovido por la administración del TPMPA podría representar un mecanismo que ayudaría a través de sus efectos metabólicos a proporcionar energía a un suje y en condiciones de apremio.

Comportamiento cinético del receptor GABA_A ante estímulos ansiogénicos.

Evidencia considerable se ha acumulado en los últimos años que señala que los receptores GABA_A convencionales muestran cambios en respuesta a numerosos estresores, tales como el nado forzado (Medina et al, 1983), la inmovilización (Braestrup et al, 1979), al sonido de fondo (Lai y Carino, 1990) y a la manipulación (Biggio et al, 1990). Más aún, ha sido observado por Lister (Lister, 1987) en ratones y corroborado por File en ratas (File et al, 1990), que la sola exposición de los animales al laberinto elevado en forma de "+" abole las propiedades ansiolíticas de las benzodiazepinas cuando los efectos de estos compuestos son probados al día siguiente de su exposición libre de fármacos a dicho laberinto; un fenómeno denominado "tolerancia al primer ensayo".

En este trabajo de tesis mediante el uso del midazolam, un miembro hidrosoluble de las benzodiazepinas, se corroboró la existencia de estos efectos y se demostró adicionalmente que dicho fenómeno se presenta muy precozmente, habiendo sido posible demostrarlo desde a las 6 horas después de la primera experiencia de los animales en el laberinto elevado en forma de "+".

Nuestros resultados coinciden adicionalmente con los obtenidos por González y File (Gonzalez y File, 1997) y otros grupos de investigadores que han observado el mismo fenómeno (Frussa-Filho et al, 1999; Pereira et al, 1999; Albrechet-Souza et al, 2008). Es interesante por otro lado señalar que el fenómeno de "tolerancia al primer ensayo" no parece ser privativo de los cambios que provoca por si mismo el laberinto elevado en forma de "+", sino que parece ser un fenómeno mas general, pues ha sido también observado que la exposición previa de los roedores a otras pruebas incondicionadas de ansiedad, tales como la caja luz-oscuridad (Rodgers y Sheperd, 1993), la prueba de las cuatro plataformas (Hascoet et al, 1997) y la prueba de evasión al olor de gato (McGregor y Dielenberg, 1999), cancela de la misma manera los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas cuando estos son evocados en roedores previamente expuestos a cada una de ellas. Adicionalmente, el fenómeno de la "tolerancia al primer ensayo" no parece depender de la exposición previa de los roedores a una prueba determinada y su evocación posterior en la misma prueba pues también se ha observado en forma cruzada. Así, Briones-Aranda y colaboradores (Briones-Aranda et al, 2005) fueron capaces de demostrar este fenómeno cuando probaron el efecto de las benzodiazepinas en la caja luz oscuridad en animales previamente expuestos al nado forzado.

Dado que las benzodiazepinas ejercen sus efectos a través de su unión al receptor GABA_A, los efectos anteriores en su conjunto sugieren que la experiencia a eventos ansiogénicos incondicionados de diversa índole induce cambios estructurales que interfieren con la unión de estos compuestos a dicho receptor, o bien que impiden la inducción de cambios alostéricos cooperativos responsables del aumento de afinidad del GABA que se observa tras la unión de las benzodiazepinas a sus sitios de unión en el receptor GABA_A y que se considera subyacen al efecto ansiolítico de este grupo de compuestos.

En apoyo de la primera posibilidad, nuestros resultados autorradiográficos mostraron que la sola exposición de las ratas al laberinto elevado en forma de "+", fue capaz de producir una disminución selectiva de la unión del [³H]flunitrazepam en el núcleo basolateral de la amígdala. Dicha disminución se observó, como ocurrió en nuestros experimentos conductuales en torno al fenómeno de tolerancia al primer ensayo, desde las 6 horas siguientes a la exposición de las ratas al laberinto, pero adquirió significancia estadística hasta las 24 horas de su exposición inicial. Tales modificaciones se acompañaron de un aumento gradual de la K_D para la unión del [³H]flunitrazepam a los receptores GABA_A en el núcleo basolateral de la amígdala, que sugiere una disminución paulatina en la afinidad de este compuesto por sus sitios receptores y que, a la par con la unión de este ligando, adquiere significancia estadística hasta las 24 horas de la exposición de las ratas al laberinto. En contraste, en nuestros estudios no se encontraron cambios significativos en el número de receptores (B_{max}) que participan en la unión del [³H]flunitrazepam a su receptor, sugiriendo que la disminución de la combinación de esta benzodiazepina observada en los experimentos de unión obedece a una disminución de su afinidad por los receptores GABA_A y no a su "enmascaramiento". Nuestros resultados a este respecto difieren de los de Chacur ([Chacur et al, 1999](#)) quien, también mediante estudios autorradiográficos, reportó que tras una exposición de 5 minutos al laberinto elevado en forma de "+" ocurría un aumento significativo en la unión del [³H]flunitrazepam a su receptor, tanto en la amígdala como en el hipocampo; pero coinciden con los de Andrews ([Andrews et al, 1992](#)) que mostraron que el estrés por manipulación aguda disminuye la unión de [³H]flunitrazepam al receptor GABA_A en membranas obtenidas de corteza cerebral. Sin embargo en este estudio, a diferencia del nuestro, la disminución en la unión del [³H]flunitrazepam a sus receptores parece obedecer a una disminución de sus sitios de unión a sus receptores (B_{max}) más que a cambios en su afinidad (K_D) ([Andrews et al, 1992](#)). La razón de estas discrepancias no se conoce, pero es posible que estén involucrados en ella variaciones en los procedimientos

experimentales utilizados por ambos grupos pues en los experimentos de Chacur ([Chacur et al, 1999](#)) la autorradiografía se practicó a los 5 min de la exposición de los animales al laberinto mientras que en nuestro los animales fueron procesados para dicho procedimiento considerablemente mas tarde (6 horas) de su exposición al laberinto. Así mismo, mientras que en los experimentos de Andrews ([Andrews et al, 1992](#)) el estímulo ansiogénico fue físico (inyección intraperitoneal de agua), en los nuestros fue psíquico (exposición al laberinto en forma de "+") y, a diferencia de nuestros experimentos, en los de Andrews ([Andrews et al, 1992](#)) el estímulo ansiogénico fue aplicado tanto 24 horas antes como inmediatamente previo al sacrificio de las ratas y el procesamiento autorradiográfico de sus cerebros. En todo caso, es posible que los cambios observados en el receptor GABA_A tras la aplicación de estímulos ansiogénicos incondicionados representen, tanto en nuestros experimentos como en los de Chacur ([Chacur et al, 1999](#)) y los de Andrews ([Andrews et al, 1992](#)), mecanismos plásticos compensatorios de habituación que ocurrirían tanto a largo, como a corto plazo, tras la exposición de los roedores a estímulos ansiogénicos incondicionados.

Molecularmente dichos cambios pudieran ser el resultado de un intercambio entre las subunidades que participan en la estructuración de los receptores GABA_A del núcleo basolateral de la amígdala y particularmente del intercambio entre la subunidades $\gamma 2$ con otros tipos de subunidades que forman el receptor GABA_A ya que, como se señaló antes, son las subunidades $\gamma 2$ las que confieren a los receptores GABA_A su sensibilidad a los efectos ansiogénicos de las benzodiazepinas ([Backus et al, 1993](#); [Chang et al, 1996](#)). En apoyo de lo anterior, cabe señalar que ha sido demostrado en la hemoglobina, que también posee una estructura cuaternaria, que intercambios entre sus subunidades constitutivas se asocian a modificaciones en la afinidad para sus ligandos ([Benesch et al, 1966](#)). Alternativamente, ya que se ha también demostrado ([Yuan y Lüscher, 2007](#)) que tanto a nivel sináptico como extrasináptico existe un intercambio rápido entre receptores GABA_A que contienen subunidades $\gamma 2$ con aquellos que no los tienen. Es también posible que tras la presencia de estímulos ansiogénicos incondicionados, el equilibrio que gobierna este intercambio favorezca la inserción de receptores GABA_A carentes de subunidades $\gamma 2$ en sinápsis regionalmente específicas. Es claro, sin embargo, que en ambos casos, el remplazo gradual de receptores GABA_A ricos en subunidades $\gamma 2$ por receptores carentes de ellas en sinapsis de estructuras involucradas en la modulación de la ansiedad, como es el caso del núcleo basolateral de la amígdala ([LeDoux, 2000](#); [Pérez de la Mora et al, 2010](#)), conduciría a una disminución de la afinidad de los receptores GABA_A por las benzodiazepinas y a la eventual desaparición de sus efectos ansiolíticos.

Finalmente la posibilidad de que la disminución de la unión del [³H]flunitrazepam a sus receptores pudiera deberse a la internalización del receptor GABA_A y su posterior degradación intracelular (Mennini *et al*, 1988) resulta poco probable, pues en nuestros experimentos no se encontraron cambios en la B_{max} que refleja el número de receptores pero si un aumento de la K_D que sugiere una disminución de la afinidad del [³H]flunitrazepam por sus sitios de unión en el receptor GABA_A.

La razón por la cual la exposición al laberinto elevado en forma de "+" afectó en forma selectiva la unión del [³H]flunitrazepam en el núcleo basolateral de la amígdala, pero no tuvo efecto sobre la unión de este compuesto en el núcleo central amigdalino ni en el hipocampo, resulta poco clara. Estudios recientes han señalado, sin embargo, que cada uno de estos núcleos juega un papel diferencial en la modulación de la ansiedad incondicionada (Pérez de la Mora *et al*, 2010; Antoniadis y McDonald, 2001; Phillips y LeDoux, 1992) y que la composición de las subunidades constitutivas de sus receptores GABA_A es diferente para cada uno de ellos (Marowsky *et al*, 2004). Es posible, entonces, que la dinámica funcional de estos receptores ante la exposición de un animal a un estímulo ansiogénico no condicionado sea solo el reflejo de estas diferencias. Nuevos estudios serán necesarios para establecer el tipo de cambios estructurales y cinéticos que dentro del receptor GABA_A subyacen al fenómeno de tolerancia al primer ensayo.

CONCLUSIÓN

Los resultados encontrados en este trabajo apoyan la existencia de receptores GABA_A rho, poseedores de una estructura cuaternaria sui generis, dentro de la amígdala de la rata y sugieren, por primera vez, que tales receptores, poseen un papel distintivo en la modulación amigdalina del miedo y la ansiedad.

Nuestros resultados muestran así mismo, que la exposición de ratas a situaciones ansiogénicas v.g. la exposición al laberinto elevado en forma de "+" cuyos brazos abiertos carecen de "pistas" (clues) tigmotácticas, induce cambios plásticos compensatorios en los receptores GABA_A convencionales cuya naturaleza parece depender de su estructura cuaternaria y de sus propiedades cinéticas consecutivas.

En suma, nuestros resultados apoyan la participación fundamental de los receptores GABA_A en la modulación de la ansiedad incondicionada e indican que la naturaleza de su estructura cuaternaria (número y tipo de subunidades constituyentes) y las propiedades cinéticas que de ella derivan, determinan su participación tanto en la expresión de sus respuestas ante estímulos ansiogénicos, como en la formación de plasticidad manifestada en la adquisición de propiedades funcionales y farmacológicas distintivas.

LITERATURA CITADA

Adolphs R, Tranel D, Damasio AR. (1998) The human amygdala in social judgment. *Nature*. 393(6684):470-474.

Aggleton JP. (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends in Neuroscience*. 16(8):328-333.

Albrechet-Souza L, Borelli KG, Brandao ML. (2008) Activity of the medial prefrontal cortex and amygdala underlies one-trial tolerance of rats in the elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*. 169:109-118.

Alvano SA. (2003) Farmacología de la neurotransmisión GABAérgica mecanismo de acción de las benzodiazepinas y otros moduladores Gabaérgicos. En: *Psiconeurofarmacología clínica*. Ed. Zieher LM. Gráfica Siltor. Buenos Aires. Pp 298-307.

Andrews N, Zharkovsky A, File SE. (1992) Acute handling-stress downregulates benzodiazepine receptors: reversal by diazepam. *European Journal of Pharmacology*. 210:247-251.

Antoniades EA y McDonald RJ. (2001) Amygdala, Hippocampus, and unconditioned fear. *Experimental Brain Research*. 138:200-209.

Applegate CD, Kapp BS, Underwood MD, McNail CL. (1983) Autonomic and somatomotor effects of amygdala central N. stimulation in awake rabbits. *Physiology & Behavior*. 31(3):353-360.

Araujo F, Ruano D, Vitorica J. (1998) Absence of association between δ and γ_2 subunits in native GABA_A receptors from rat brain. *European Journal of Pharmacology*. 347:347-353.

Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, Vitorica J. (1996) Molecular and pharmacological characterization of native cortical γ -aminobutyric acid_A receptors containing both α_1 and α_3 subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 44:27902-27911.

Asan E. (1998) The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*. 142:1-118.

Backus KH, Arigoni M, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, Mohler H, Benson JA. (1993) Stoichiometry of a recombinant GABA_A-receptor deduced from mutation-induced rectification. *Neuro Report* 5:285-288.

Barili P, De Carolas G, Zaccheo D, Amenta F. (1998) Sensitivity to aging of the limbic dopaminergic system: a review. *Mechanisms of Ageing and Development*. 106:57-92.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. (1998) *International Union of Pharmacology: XV. Subtypes of γ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function.* *Pharmacological Reviews*. 50:291-313.

Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR. (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science*. 269(5227):1115-1118.

Benesch R, Benesch RE, Tyuma I. (1966) Subunit Exchange and ligand binding, II. The mechanism of the allosteric effect in hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 56:1268-1274

Benke D, Fritschy JM, Trzeciak A, Bannwarth W, Mohler H. (1994) Distribution, prevalence and drug binding profile of GABA_A receptor subtypes differing in β -subunit variant. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:27100-27107.

Benke D, Honer M, Michel C, Mohler H. (1996) GABA_A receptor subtypes differentiated by their γ -subunits variants: prevalence, pharmacology and subunit architecture. *Neuropharmacology*. 35:1413-1423.

Biggio G, Concas A, Corda MG, Giorgi O, Sanna E, Serra M. (1990) GABAergic and dopaminergic transmission in the rat cerebral cortex: effect of stress, anxiolytic and anxiogenic drugs. *Pharmacology and Therapeutics*. 48(2):121-142.

Blanchard DC y Blanchard RJ. (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*. 81(2):281-290.

Bormann J y Feigenspan A. (1995) GABA_C receptors. *Trends in Neuroscience*. 18:515-518.

Boue-Grabot E, Taupignon A, Tramu G, Garret M. (2000) Molecular and electrophysiological evidence for a GABA_C receptor in thyrotropin-secreting cells. *Endocrinology*. 141(5):1627-1632.

Braestrup C, Nielsen M, Nielsen EB, Lyon M. (1979) Benzodiazepine receptors in the brain as affected by different experimental stresses: the changes are small and not unidirectional. *Psychopharmacology*. 65(3):273-277.

Briones-Aranda A, Rocha L, Picazo O. (2005) Alterations in GABAergic function following forced swimming stress. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 80(3):463-470.

Carlson N. (1996) *Fundamentos de Psicología Fisiológica*. 3ª Edición. Prentice Hall. España. Pp 326-336.

Carrasco GA y Van de Kar L. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*. 463:252-272.

Chacur C, Raymond R, Hipólido DC, Giugliano EB, Leite JR, Nobrega JN. (1999) Immediate increase in benzodiazepine binding in rat brain after a single brief experience in the plus maze: a paradoxical effect. *Neuroscience Letters*. 269(1):29-32.

Chang Y, Wang R, Barot S, Weiss DS. (1996) Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor. *Journal of Neuroscience*. 16:5415-5424.

Chapman WP, Schroeder HR, Geyer G, Brazier MA, Fager C, Poppen JL, Solomon HC, Yakovlev PI. (1954) Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science*. 120(3127):949-950.

Chebib M y Johnston GA. (2000) GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *Journal of Medicinal Chemistry*. 43(8):1427-1447.

Chebib M. (2004) GABA_C receptor ion channels. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 31(11):800-804.

Collins DR y Paré D. (1999) Reciprocal changes in the firing probability of lateral and central medial amygdala neurons. *Journal of Neuroscience*. 19(2):836-844.

Crestani F, Lorez M, Baer K, Essrich C, Benke D, Laurent JP, Belzung C, Fritschy JM, Luscher B, Mohler H. (1999) Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. *Nature Neuroscience*. 2(9):833-839.

Cunha C, Monfils MH, Ledoux JE. (2010) GABA(C) Receptors in the Lateral Amygdala: A Possible Novel Target for the Treatment of Fear and Anxiety Disorders?. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 12;4:6.

Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada S, Antonarakis SE, Guggino WB, Uhl GR, Kazazian HH. (1991) Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(7):2673-2677.

Dahlström A y Fuxe K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 20(7):398—399.

Davis M y Whalen PJ. (2001) The amygdala: vigilance and emotion. *Molecular Psychiatry*. 6(1):13-34.

Delaney AJ y Sah P. (1999). GABA Receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. *Journal of Neuroscience*. 19(22):9698-9704.

Delaney AJ y Sah P. (2001). Pathway-specific targeting of GABA(A) receptor subtypes to somatic and dendritic synapses in the central amygdala. *Journal of Neurophysiology*. 86(2):717-723.

Deschaux O, Froestl W, Gottesmann C. (2006) Influence of a GABA(B) and GABA(C) receptor antagonist on sleep-waking cycle in the rat. *European Journal of Pharmacology*. 535(1-3):177-181.

Drew CA, Johnston GA, Weatherby RP. (1984) Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neuroscience Letters*. 52(3):317-321.

Drew CA y Johnston GA. (1992) Bicuculline- and baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid binding to rat cerebellar membranes. *Journal of Neurochemistry*. 58(3):1087-1092.

Duke RK, Chebib M, Balcar VJ, Allan RD, Mewett KN, Johnston GA. (2000) (+)- and (-)-cis-2-aminomethylcyclopropanecarboxylic acids show opposite pharmacology at recombinant rho(1) and rho(2) GABA(C) receptors. *Journal of Neurochemistry*. 75:2602 – 2610.

Engin E y Treit D. (2008) The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 32(6):1399-1419.

Enz R, Brandstätter JH, Hartveit E, Wässle H, Bormann J. (1995) Expression of GABA receptor rho 1 and rho 2 subunits in the retina and brain of the rat. *European Journal of Neuroscience*. 7(7):1495-1501.

Enz R y Cutting GR. (1998) Molecular composition of GABA_C receptors. *Vision Research*. 38(10):1431-1441.

Enz R y Cutting GR. (1999) GABA_C receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *European Journal of Neuroscience*. 11(1):41-50.

Esmaeili A, Lynch JW, Sah P. (2009) GABA_A receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. *Journal of Neurophysiology*. 101(1):341-349.

Everitt BJ, Cardinal RN, Parkinson JA, Robbins TW. (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 985:233-250.

Fallon JH y Ciofi P. (1992) Distribution of monoamines within the amygdala. En: *The Amygdala. Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. Ed. Aggleton JP. Wiley-Liss. New York. Pp 97-114.

Feigenspan A y Bormann J. (1994) Differential pharmacology of GABA_A and GABA_C receptors on rat retinal bipolar cells. *European Journal of Pharmacology*. 288(1):97-104.

Feigenspan A, Wässle H, Bormann J. (1993) Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retina bipolar cells. *Nature*. 361:159-162.

Feldman S y Weidenfeld J. (1998) The excitatory effects of the amygdala on hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses are mediated by hypothalamic norepinephrine, serotonin, and CRF-41. *Brain Research Bulletin*. 45(5):389-393.

Fernández-Guasti A y Picazo O. (1992) Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology*. 17(6):681-689.

File S, Zangrosi H Jr, Sanders FL, Mabbutt PS. (1994) Raised cortisone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 113:543-546.

File SE, Mabbutt PS, Hitchcott PK. (1990) Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 102(1):98-101.

File SE. (1993) The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behavioural Brain Research*. 58(1-2):199-202.

Freeman EW, Purdy RH, Coutifaris C, Rickels K, Paul SM. (1993) Anxiolytic metabolites of progesterone: correlation with mood and performance measures following oral progesterone administration to healthy females volunteers. *Neuroendocrinology*. 58:478-484.

Fritschy JM y Mohler H. (1995) GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *The Journal of Comparative Neurology*. 359(1):154-194.

Frussa-Filho R, Barbosa-Junior H, Silva RH, Da CC, Mello CF. (1999) Naltrexone potentiates the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in rats exposed to novel environments. *Psychopharmacology*. 147:168-173.

Frye CA y Walf AA. (2004) Estrogen and/or progesterone administered systemically or to the amygdala can have anxiety-, fear-, and pain-reducing effects in ovariectomized rats. *Behavioral Neuroscience*. 118(2):306-313.

Fuxe K, Jacobsen KX, Höistad M, Tinner B, Jansson A, Staines WA, Agnati LF. (2003) The dopamine D1 receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: relationship to the dopamine innervation. *Neuroscience*. 119(3):733-746.

Gibbs ME y Johnston GA. (2005) *Opposing roles for GABA_A and GABA_C receptors in short-term memory formation in young chicks.* *Neuroscience.* 131(3):567-576.

Gloor P, Olivier A, Quesney LF. (1981) *The role of the amygdale in the expression of psychic phenomena in temporal lobe seizures.* En: *The Amygdala Complex.* Elsevier. Amsterdam. Pp 489 – 498.

Goddard GV. (1964) *Amygdaloid Stimulation and learning in the rat.* *Journal of Comparative & Physiological Psychology.* 58:23-30.

Gonzalez LE y File SE. (1997) *A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state of the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus.* *Journal of Neuroscience.* 17(4):1505-1511.

Gray JA y McNaughton N. (2002) *The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System.* 2ª Edición. Oxford University Press. USA. Pp 448.

Greka A, Lipton SA, Zhang D. (2000) *Expression of GABA(C) receptor rho1 and rho2 subunits during development of the mouse retina.* *European Journal of Neuroscience.* 12(10):3575-3582.

Gulinello M, Orman R, Smith SS. (2003) *Sex differences in anxiety, sensorimotor gating and expression of the alpha4 subunit of the GABA_A receptor in the amygdala after progesterone withdrawal.* *European Journal of Neuroscience.* 17(3):641-648.

Gustafson EL, Card JP, Moore RY. (1986) *Neuropeptide Y localization in the rat amygdaloid complex.* *The Journal of Comparative Neurology.* 251(3):349-362.

Gutierrez A, Khan ZU, De Blas AL. (1994) *Immunocytochemical localization of g2 short and g2 long subunits of the GABA_A receptor in the rat brain.* *Journal of Neuroscience.* 14:7168-7179.

Hadingham KL, Wingrove P, Le Bourdelles B, Palmer KJ, Ragan CI, Withing PJ. (1993) *Cloning of cDNA sequences encoding human α_2 and α_3 γ -aminobutyric acid_A receptor subunits and characterization of the benzodiazepine pharmacology of recombinant α_1 , α_2 , α_3 - y α_5 -containing human γ -aminobutyric acid_A receptors.* *Molecular Pharmacology.* 43:970-975.

Hascoet M, Bourin M, Couetoux du Tertre A. (1997) Influence of prior experience on mice behavior using the four-plate test. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 58(4):1131-1138.

Hedblom E y Kirkness EF. (1997) A novel class of GABA_A receptor subunit in tissues of the reproductive system. *The Journal of Biological Chemistry*. 272:15346-15350.

Heinze G. (2003) La ansiedad: cómo se concibe actualmente. *Ciencia*. 54(2):8-15.

Henninger SMH, Ohi F, Holter SM, Weißenbacher P, Toschi M, Löscher P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R. (2000) Unconditioned anxiety and social behavior in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research*. 111:153-163.

Herman JP, Ostrander MM, Mueller MK, Figuereido HF. (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*. 29:1201-1213.

Jankord R y Herman JP. (2008) Limbic regulation of hypothalamo- pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1148:64-73.

Kaada BR. (1951) Somato-motor, autonomic and electrocorticographic responses to electrical stimulation of rhinencephalic and other structures in primates, cat, and dog; a study of responses from the limbic, subcallosal, orbito-insular, piriform and temporal cortex, hippocampus-fornix and amygdala. *ACTA Physiologica Scandinavica Supplement*. 24(83):1-262.

Khan ZU, Fernando L, Escriba P, Busquets X, Mallet J, Miralles C, Filla M, De Blas AL. (1993) Antibodies to the human γ_2 -subunit of the γ -aminobutyric acidA/benzodiazepine receptor. *Journal of Neurochemistry*. 60:961-971.

Khan ZU, Gutiérrez A, De Blas AL. (1996) The α_1 and α_6 subunits can coexist in the same cerebellar GABA_A receptor maintaining their individual benzodiazepine-binding specificities. *Journal of Neurochemistry*. 66:685-691.

Kirk IJ. (1998) Frequency modulation of hippocampal theta by the supramammillary nucleus, and other hypothalamo-hippocampal interactions: mechanisms and functional implications. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 22:291-302.

Klein RL, Mascia MP, Harkness PC, Hadingham KL, Whiting PJ, Harris RA. (1995) Regulation of allosteric coupling and function of stably expressed gamma-aminobutyric acid (GABA)_A receptors by chronic treatment with GABA_A and benzodiazepine agonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 274(3):1484-1492.

Kling AS, Tachiki K, Lloyd R. (1993) Neurochemical correlates of the Klüver-Bucy syndrome by *in vivo* microdialysis in monkey. *Behavioural Brain Research*. 56(2):161-170.

Kluver H y Bucy PC. (1937) *Psychic blindness and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in rhesus monkeys*. *American Journal of Physiology*. 119:352-353.

Kocsis K, Kiss J, Csáki A, Halász B. (2003) Location of putative glutamatergic neurons projecting to the medial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain Research Bulletin*. 61(4):459-468.

Koob GH y Heinrich SC. (1999) A role for corticotrophin releasing factor and urocortin in behavioural response to stressors. *Brain Research*. 848:141-152.

Korpi ER, Kuner T, Kristo O, Mohler M, Herb A, Luddens H, Seeburg PH. (1994) Small N-terminal deletion by splicing in cerebellar $\alpha 6$ subunit abolishes GABA_A receptor function. *Journal of Neurochemistry*. 63:1167-1170.

La Bar KS, LeDoux JE, Spencer DD, Phelps EA. (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *Journal of Neuroscience*. 15:6846-6855.

Lai H y Carino MA. (1990) Acute white noise exposure affects the concentration of benzodiazepine receptors in the brain of the rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 36(4):985-987.

LeDoux JE. (2000) *Emotion circuits in the brain*. *The Annual Review of Neuroscience*. 23:155-184.

Li M y De Blas AL. (1997) Coexistence of two β subunit isoforms in the same γ -aminobutyric acid type A receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 272:16564-16569.

Likhtik E, Popa D, Apergis-Schoute J, Fidacaro GA, Paré D. (2008) Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature*. 454:642-645.

Lister RG. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*. 92(2):180-185.

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rülke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science*. 290:131-4.

Lukasiewicz PD, Maple BR, Werblin FS. (1994) A novel GABA receptor on bipolar cell terminals in the tiger salamander retina. *Journal of Neuroscience*. 14(3 Pt 1):1202-1212.

Macedo CE, Castilho VM, De Souza e Silva MA, Brandao ML. (2002) Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Research Bulletin*. 59:189-195.

Maisonnette S, Villela C, Carotti AP, Landeira-Fernandez J. (2000) Microinfusion of nefazodone into the basolateral nucleus of the amygdala enhances defensive behavior induced by NMDA stimulation of the inferior colliculus. *Physiology & Behavior*. 70:234-247.

Marksitzer R, Benke D, Fritschy JM, Trzeciak A, Bannwarth W, Mohler H. (1993) GABA_A receptors containing the α_2 -subunit in situ. *Journal of Receptor Research*. 13:467-477.

Marowsky A, Fritschy JM, Vogt KE. (2004) Functional mapping of GABA_A receptor subtypes. *European Journal of Neuroscience*. 20: 1281-1289.

Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE. (2005) A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron*. 48(6):1025-1037.

Mascagni F y McDonald AJ. (2003) Immunohistochemical characterization of cholecystinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Research*. 976(2):171-184.

McDonald AJ y Pearson JC. (1989) Coexistence of GABA and peptide immunoreactivity in non-pyramidal neurons of the basolateral amygdala. *Neuroscience Letters*. 100(1-3):53-58.

McDonald AJ. (1994) Neuronal localization of glutamate receptor subunits in the basolateral amygdala. *Neuroreport*. 6(1):13-16.

McDonald RL y Olsen RW. (1994) GABA_A receptor channels. *The Annual Review of Neuroscience*. 17:569-602.

McGaugh JL, Cahill L, Roozendaal B. (1996) Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(24):13508-13514.

McGregor IS y Dielenberg RA. (1999) Differential anxiolytic efficacy of a benzodiazepine on first versus second exposure to a predatory odor in rats. *Psychopharmacology*. 147(2):174-181.

Medina JH, Novas ML, De Robertis E. (1983) Changes in benzodiazepine receptors by acute stress: different effect of chronic diazepam or RO 15-1788 treatment. *European Journal of Pharmacology*. 96(3-4):181-5.

Mehta AK y Shank RP. (1995) Characterization of a benzodiazepine receptor site with exceptionally high affinity for Ro 15-4513 in the rat CNS. *Brain Research*. 704:289-297.

Mehta AK y Ticku MK. (1999) An update on GABA(A) receptors. *Brain Research Reviews*. 29:196-217.

Mennini T, Gobbi M, Perin L, Salmona M. (1988) Rapid internalization of benzodiazepine receptors in the rat cortex induced by handling. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. 45:263-73.

Mercer LD, Le VQ, Nunan J, Jones NM, Beart PM. (2000) Direct visualization of cholecystinin subtype2 receptors in rat central nervous system using anti-peptide antibodies. *Neuroscience Letters*. 293(3):167-170.

Mertens S, Benke D, Mohler H. (1993) GABA_A receptor populations with the novel subunit combinations and drug binding profiles identified in brain by α_5 - and δ -subunit-specific immunopurification. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:5965-5973.

Millhouse OE. (1986) The intercalated cells of the amygdala. *The Journal of Comparative Neurology*. 247:246-271.

Millan MJ. (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*. 70(2):83-244.

Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, Deuchars S. (2004) Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA_A and GABA_C receptor subunits in the native central neurons. *Journal of Neuroscience*. 24:7241–7250.

Morales M y Bloom FE. (1997) The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *Journal of Neuroscience*. 17(9):3157-3167.

Moss SJ y Smart TG. (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2(4):240-250.

Motulsky HJ (2003) *Prism 4 statistics guide—statistical analysis for laboratory and clinical researchers*. GraphPad Software Inc, San Diego, pp 32–33.

Mrzljak L. (2003) mGluR subtypes in neuronal circuits of the primate and rodent brain: Potential morphological substrate for psychiatric disorders. *European Neuropsychopharmacology*. 13(Suppl 4):S113-S114.

Muñoz-Abellán C, Armario A, Nadal R (2010) Do odors from different cats induced equivalent unconditioned and conditioned responses in rats? *Physiology & Behavior*. 99:388–394.

Niehoff DL y Kuhar MJ. (1983) Benzodiazepine receptor: localization un rat amygdala. *Journal of Neuroscience*. 3:2091-2097.

Nuche-Bricaire AJ. (2008) *Estudio conductual en torno al posible papel de los receptores GABA_C amigdalinos en la modulación de la ansiedad en la rata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Psicología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Olsen RW y Sieghart W. (2008) *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update*. *Pharmacological Reviews*. 60(3):243-260.

Pan WX y McNaughton N. (2002) The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. *European Journal of Neuroscience*. 16(9):1797-1809.

Pan Y y Qian H. (2005) Interactions between rho and gamma2 subunits of the GABA receptor. *Journal of Neurochemistry*. 94(2):482-490.

Pape HC y Driesang RB. (1998) Ionic mechanisms of intrinsic oscillations in neurons of the basolateral amygdaloid complex. *Journal of Neurophysiology*. 79(1):217-226.

Paré D, Quirk GJ, Ledoux JE. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *Journal of Neurophysiology*. 92(1):1-9.

Paxinos G y Watson C. (1986) *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates*. 2a Edición. Academic. Press. New York, USA.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14(3):149-167.

Pereira JK, Vieira RJ, Konishi CT, Ribeiro RA, Frussa-Filho R. (1999) The phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is abolished by the introduction of a motivational conflict situation. *Life Science*. 65:L101-L107.

Pérez de la Mora M, Cárdenas-Cachón L, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Jacobsen K, Höistad M, Agnati L, Fuxe K. (2005) Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. *Neuroscience Letters*. 377(2):101-105.

Pérez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K. (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in Neurobiology*. 90(2):198-216.

Perez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramírez M, Marcellino D, Hansson AC, Fuxe K. (2012). Distribution of dopamine D(2)-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. *Neuroscience*. 201:252-266.

Pérez de la Mora M, Jacobsen KX, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C, Fuxe K. (2008) Wiring and volume transmission in rat amygdala. Implications for fear and anxiety. *Neurochemical Research*. 33(8):1618-1633.

Pérez de la Mora M, Lara-García D, Jacobsen KX, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia C, Escamilla-Marvan E, Fuxe K. (2006) Anxiolytic-like effects of the selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist MPEP after its intra-amygdaloid

microinjection in three different non-conditioned rat models of anxiety. *European Journal of Neuroscience*. 23:2749–2759.

Pérez de la Mora M, Possani LD, Tapia R, Teran L, Palacios R, Fuxe K, Hökfelt T, Ljungdahl A. (1981) Demonstration of central gamma-aminobutyrate-containing nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxylase. *Neuroscience*. 6(5):875-895.

Phillips RJ y LeDoux JE. (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*. 106:274-285.

Picazo O y Fernández-Guasti A. (1995) Antianxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites; an evaluation using the burying behavior test. *Brain Research*. 680:135-141.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaer A, Sieghart W, Sperk G. (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult brain. *Neuroscience*. 101(4):815-850.

Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. (1991) Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the national Academy of Science of the United States of America*. 88(10):4318-4322.

Pralong E, Magistretto O, Stoop R. (2002) Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structure and their relevance for some psychiatric disorders. *Progress in Neurobiology*. 67:173-202.

Pratt JA. (1992) The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacology & Therapeutics*. 55:149-181.

Qian H y Dowling JE. (1993) Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature*. 361(6408):162.164.

Qian H y Ripps H. (1999) Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA rho- and gamma 2-subunits. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*. 266(1436):2419-2425.

Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Paré D. (2003) Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons. *Journal of Neuroscience*. 23(25):8800-8807.

Quirk K, Gillard NP, Ragan CI, Whiting PJ, McKernan RM. (1994) Model of subunit composition of γ -aminobutyric acidA receptor subtypes expressed in rat cerebellum with respect to their α and γ/δ subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:16020-16028.

Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. (1996) Desing and in vitro pharmacology of a selective γ -aminobutyric acid C receptor antagonist. *Molecular Pharmacology*. 50:1024-1030.

Rezayat M, Roohbakhsh A, Zarrindast M-A, Massoudi R, Djahanguiri B. (2005) Cholecystokinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. *Physiology & Behavior*. 84:775–782.

Richards G, Schoch P, Jencks F. (1991) Benzodiazepine receptors and their ligands. En: 5HT1A agonists, 5HT3 antagonists and Benzodiazepine. Ed. Rodgers RJ, Cooper SJ, John Wiley & Sons Ltd. UK. Pp 1-30.

Roberts GW, Woodhams PL, Polak JM, Crow TJ. (1982) Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the amygdaloid complex. *Neuroscience*. 7(1):99-131.

Rodgers RJ y Shepherd JK. (1993) Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice. *Psychopharmacology*. 113(2):237-242.

Rodgers RJ. (1997) Animal models of 'anxiety': where next? *Behavioural Pharmacology*. 8(6-7):477-496.

Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. (2007) Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA rho1 receptor. *Neuroscience Research*. 57(3):347-353.

Royer S, Martina M, Paré D. (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *Journal of Neuroscience*. 19(23):10575-10583.

Royer S, Martina M, Paré D. (2000) Polarized synaptic interactions between intercalated neurons of the amygdala. *Journal of Neurophysiology*. 83:3509–3518.

Ruano D, Benavides J, Machado A, Vitorica J. (1995) Aging-associated changes in the pharmacological properties of the benzodiazepine (ω) receptor isotypes in the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 64:867-873.

Rudolph U, Crestani F, & Möhler H. (2001) *GABA_A receptor subtypes: Dissecting their pharmacological functions*. Trends in Pharmacological Sciences. 22(4):188-194.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler, H. (1999) *Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes*. Nature. 401:796-800.

Saha S. (2005) *Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 32(5-6):450-456.

Sajdyk TJ y Shekhar A. (1997) *Excitatory receptor antagonists block the cardiovascular and anxiety responses elicited by γ -aminobutyric acid_A receptor blockade in the basolateral amygdala of rats*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 283:969-977.

Sanders SK y Shekhar A. (1995) *Regulation of anxiety by GABA_A receptors in the rat amygdala*. Pharmacology Biochemistry & Behavior. 52:701-706.

Schmid G, Sala, R, Bonanno G, Raiteri M. (1998) *Neurosteroids may differentially, affect the function of two native GABA_A receptor subtypes in the rat brain*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 357(4):401-407.

Scibilia RJ, Lachowicz JE, Kilts CD. (1992) *Topographic nonoverlapping distribution of D1 and D2 dopamine receptors in the amygdaloid nuclear complex of the rat brain*. Synapse. 11(2):146-154.

Seabrook GR, Howson W, Lacey MG. (1990) *Electrophysiology characterization of potent agonists and antagonists at pre- and post-synaptic GABA_B receptors on neurones in rat brain slices*. British Journal of Pharmacology. 101:949-957.

Shimada S, Cutting G, Uhl GR. (1992) *γ -Aminobutyric acid ρ 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive GABA responses in Xenopus oocytes*. Molecular Pharmacology. 41:683-687.

Sibille E, Pavlides C, Benke D, Toth M. (2000) *Genetic inactivation of the Serotonin(1A) receptor in mice results in downregulation of major GABA(A) receptor alpha subunits, reduction of GABA(A) receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety*. Journal of Neuroscience. 20(8):2758-2765.

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. (1994) *Basic Neurochemistry*. 3a Edición. Raven Press. New York. 1080 pp.

Silverstone PH. (2004) *Qualitative review of SNRIs in anxiety*. *Journal of Clinical Psychiatry*. 65 Suppl 17:19-28.

Silvilotti L y Nistri A. (1991) *GABA receptor mechanisms in the central nervous system*. *Progress in Neurobiology*. 36:35-92.

Slany A, Zezula J, Tretter V, Sieghart W. (1995) *Rat β_3 subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells form high affinity [3 S]t-butylbicyclophosphorothionate binding sites modulated by several allosteric ligands of γ -aminobutyric acid type A receptors*. *Molecular Pharmacology*. 48:385-391.

Smialowska M, Wieronska JM, Wedzony K. (2002) *A search for colocalization of mglu1 receptors with CRF or NPY in the rat brain amygdala*. *Folia Histochemica et Cytochemica*. 40(2):153-154.

Smith TAD. (2001) *Tipa A γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment*. *British Journal of Biomedical Science*. 58:111-121.

Stephens DN, Schneider HH, Kehr W, Jensen LH, Petersen E, Honore T. (1987) *Modulation of anxiety by beta-carbolines and other benzodiazepine receptor ligands: relationship of pharmacological to biochemical measures of anxiety*. *Brain Research Bulletin*. 19:309-318.

Sun N y Cassell MD. (1993) *Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala*. *The Journal of Comparative Neurology*. 330(3):381-404.

Sun N, Yi H, Cassell MD. (1994) *Evidence for a GABAergic interface between cortical afferents and brainstem projection neurons in the rat central extended amygdala*. *The Journal of Comparative Neurology*. 340(1):43-64.

Swanson LW y Petrovich GD. (1998) *What is the amygdala?*. *Trends in Neuroscience*. 21(8):323-331.

Takayama K y Miura M. (1992) *Difference in distribution of glutamate-immunoreactive neurons projecting into the subretrofacial nucleus in the rostral ventrolateral medulla of SHR and WKY: a double-labeling study*. *Brain Research*. 570(1-2):259-266.

Takechi K, Fujiwara A, Watanabe Y, Kamei C (2009) Participation of GABA-ergic system in the epileptogenic activity induced by teicoplanin in mice. *Epilepsy Research*. 84:127–134.

Tecott LH. (2000) Designer genes and anti-anxiety drugs. *Nature Neuroscience*. 3(6):529–530.

Thomas SR, Lewis ME, Iversen SD. (1985) Correlation of [3H]diazepam binding density with anxiolytic locus in the amygdala complex of the rat. *Brain Research*. 342:85-90.

Treit D, Menard J, Royan C. (1993) Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 44:463–469.

Turski WA, Cavalheiro EA, Calderazzo-Filho LS, Kleinrock Z, Czuczwar SJ, Turski L (1985) Injections of picrotoxin and bicuculline into the amygdaloid complex of the rat: an electroencephalographic, behavioral and morphological analysis. *Neuroscience* 14:37–53.

Ursin H. (1960) The temporal lobe substrate of fear and anger. A review of recent stimulation and ablation studies in animals and humans. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 35:378-396.

Ungerstedt U. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum*. 367:1-48.

Vahl TP, Ulrich-Lai M, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, D'Alessio DA, Herman JP (2005) Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 289:E823–E828.

Vazdarjanova A, Cahill L, McGaugh JL. (2001) Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*. 14(4):709-718.

Wang TL, Guggino WB, Cutting GR. (1994) A novel gamma-aminobutyric acid receptor subunit ($\rho 2$) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. *Journal of Neuroscience*. 14 (11 Pt 1):6524-6531.

Weiskrantz L. (1956) Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*. 49(4):381-391.

Wermuth CG y Biziere K. (1986) Pyridazinyl-GABA derivatives: a new class of synthetic GABA_A antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences*. 7:421-424.

Whiting P, McKernan RM, Iversen LL. (1990) Another mechanism for creating diversity in gamma-aminobutyrate type A receptor: RNA splicing directs expression of two forms of gamma2 phosphorylation site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:9966-9970.

Wieronska JM, Branski P, Palvcha A, Smialowska M. (2001) The effect of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists, ACPC and MK-801 on NPY and CRF-like immunoreactivity in the rat brain amygdala. *Neuropeptides*. 35(5-6):219-226.

Wisden W, Herb A, Wieland H, Keinänen K, Luddens H, Seeburg PH. (1991) Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABA_A receptor α_4 subunits. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 289:227-230.

Wisden W, Korpi ER, Bahn S. (1996) The cerebellum: a model system for studying GABA(A) receptor diversity. *Neuropharmacology*. 35:1139-1160.

Wong G y Skolnick P. (1992) Ro 15-4513 binding to GABA_A receptors: subunit composition determines ligand efficacy. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 42(1):107-110.

Woodward RM, Polenzani L, Miledi R. (1992) Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl⁻ channel inhibitors. *Molecular Pharmacology*. 42(1):165-173.

Yadin E, Thomas E, Grishkalt HL, Strickland CE. (1993) The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiology & Behavior*. 53:1077-1083.

Yang L, Omori K, Otani H, Suzukawa J, Inagaki C. (2003) GABA_C receptor agonist suppressed ammonia-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons by restoring phosphorylated BAD level. *Journal of Neurochemistry*. 87(3):791-800.

Ymer S, Draguhn A, Wisden W, Werner P, Keinänen K, Schofield PR, Sprengel R, Pritchett DB, Seeburg PH. (1990) Structural and functional characterization of the γ_1 subunit of the GABA_A/benzodiazepine receptor. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 9:3261-3267.

Yuan X y Lüscher B. (2007) Trafficking of post-synaptic GABA_A receptors by receptor associated proteins. En: *The GABA Receptors*. Third Edition. Enna, S.J, and Möhler, H (Eds). Humana Press, Inc. New Jersey pp. 41-68.

Zarrindast M, Rostami P, Sadeghei-Hariri M. (2001) GABA(A) but not GABA(B) receptor stimulation induces anti-anxiety profile in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 69:9-15.

Zhang D, Pan ZH, Awobuluyi M, Lipton SA. (2001) Structure and function of GABA(C) receptors: a comparison of native versus recombinant receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22(3):121-132.

Zhang D, Pan ZH, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA. (1995) Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(25):11756-11760.

Zimmerberg B, Brunelli SA, Fluty AJ, Frye CA. (2005) Differences in affective behaviors and hippocampal allopregnanolone levels in adult rats of lines selectively bred for infantile vocalizations. *Behavioural Brain Research*. 159(2):301-311.

Zola-Morgan S, Squire LR, Alvarez-Royo P, Clower RP. (1991) Independence of memory functions and emotional behavior: separate contributions of the hippocampal formation and the amygdala. *Hippocampus*. 1(2):207-220.

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figuras

Figura 1: Primera ilustración del “núcleo amigdalino” en el hemisferio cerebral humano.....	11
Figura 2: Núcleos de la amígdala en el cerebro de la rata.....	12
Figura 3: Receptores GABA _A	22
Figura 4: Laberinto Elevado en forma de “+”.....	31
Figura 5: Representación esquemática de los sitios de implantación de cánulas.....	43
Figura 6: Efectos de la microinyección bilateral de TPMPA en la amígdala sobre el comportamiento de ratas en el laberinto elevado en forma de “+”.....	44
Figura 7: Efectos de la microinyección bilateral de bicuculina en la amígdala sobre el comportamiento de ratas en el laberinto elevado en forma de “+”.....	45
Figura 8: Efectos de la microinyección bilateral de TPMPA y bicuculina en la locomoción de las ratas, medida en la prueba de campo abierto.....	46
Figura 9: Efectos de la microinyección bilateral de TPMPA en la amígdala de ratas sobre los niveles de corticosterona en el plasma.....	47
Figura 10: Efectos de la inyección intraperitoneal de midazolam en el comportamiento de las ratas en el laberinto elevado en forma de “+”.....	48
Figura 11: Efectos del midazolam en el laberinto elevado en forma de “+” en animales con una experiencia previa libre de fármacos en el mismo laberinto.....	49
Figura 12: Unión de [³ H]flunitrazepam en la amígdala de la rata tras una experiencia previa en el laberinto elevado en forma de “+” sin ningún fármaco.....	50
Figura 13: Unión de [³ H]flunitrazepam en el hipocampo de la rata tras su exposición libre de fármacos al laberinto elevado en forma de “+”.....	51
Figura 14: Constante de disociación (KD) de la unión del [³ H]flunitrazepam a su receptor en el BLA de ratas sometidas al laberinto elevado en forma de “+”.....	52
Figura 15: Número de receptores (B _{max}) que participan en la unión del [³ H]flunitrazepam a su receptor en el BLA de ratas sometidas al laberinto elevado en forma de “+”.....	52

Cuadros

Cuadro 1: Efectos de la lesión y estimulación eléctrica de la amígdala.....	13
Cuadro 2: Farmacología de los receptores GABAérgicos.....	20
Cuadro 3: Drogas que interactúan con los receptores GABA _A convencionales.....	21
Cuadro 4: Peso molecular de las subunidades del receptor GABA _A (kDa).....	25
Cuadro 5: Porcentaje de los sitios de unión inmunoprecipitados por anticuerpos específicos en relación a las otras subunidades del receptor GABA _A en cerebros adultos.....	25
Cuadro 6: Distribución de algunas de las subunidades del receptor GABA _A	26
Cuadro 7: Ligandos y localización de las subunidades α	29