



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Doctorado en Ciencias Biomédicas**

### **“Impacto de la diabetes y el síndrome metabólico sobre los niveles de ansiedad en la rata”**

**Tesis que para optar por el grado de:  
Doctora en Ciencias**

**Presenta:**

**Biol. Daniela Rebolledo Solleiro**

**Tutor principal:**

**Dr. Miguel Pérez de la Mora  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Comité tutorial:**

**Dra. Marcia Hirirart Urdanivia  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Gabriel Roldán Roldán  
Facultad de Medicina, UNAM**

**México D.F. Septiembre, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**"BUENA ES LA  
CIENCIA Y  
PROVECHOSA PARA  
LOS QUE VEN EL SOL"**

**ECLESIASTÉS 7:11**

**... A mi Dios: por quien existo y para quien existo...**

# AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la UNAM, por todo lo que me ha dado para mi formación profesional. Ser egresada de la máxima casa de estudios de nuestro país siempre será motivo de orgullo y satisfacción.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por aceptarme como su alumna y fomentar en mí la excelencia académica que lo distingue.

Al Instituto de Fisiología Celular por las facilidades presentadas para la realización de esta tesis. Especialmente al laboratorio AL-203 del edificio de Neurociencias, por haber sido mi “segunda casa” durante todo este tiempo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico (no. beca 207084) durante el periodo 2007-2012 para poder realizar este proyecto.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por los donativos con los que se financió buena parte del proyecto que aquí se presenta (IN204314 e IN203111). A la Dra. Marcia Hiriart y todo su equipo de trabajo con quienes se realizó este proyecto en colaboración. A los donativos otorgados a su grupo de investigación, tanto como por el CONACYT (CB2009-131647), como por el PAPIIT (IN215611).

Al apoyo técnico brindado por la Q.F.B. Minerva Crespo Ramírez y Félix Sierra, cuyos conocimientos y habilidades fueron invaluable en la realización de este estudio.

A los Dres. Claudia Rivera Cerecedo y Dr. Héctor Malagón Rivero por el cuidado de los animales en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular

A Naty Aguilar y Víctor por sus atenciones, cuidados y su ayuda constante en todo lo concerniente con el orden del laboratorio durante todo el tiempo que me tocó trabajar cerca de ustedes.

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Agradezco infinitamente a los miembros de mi Comité tutorial, el Dr. Miguel Pérez de la Mora, la Dra. Marcia Hiriart y el Dr. Gabriel Roldán por acompañarme en esta aventura. Este proyecto no hubiera podido concluirse sin su gran experiencia, su carácter crítico, su ánimo por hacer buena ciencia y por su generosidad para darme de todo eso durante todos estos años. Doc, gracias por darme un lugar en su laboratorio, gracias por compartir no sólo de su conocimiento, sino los chistes, los cineclubs, las recetas de cocina, las anécdotas de sus viajes, de su vida y de sus tiempos de estudiante. Marcia, gracias por enseñarme de tu pasión por la ciencia y por la vida; gracias por tu apoyo constante, tus consejos y por motivarme a no rendirme y a continuar con la investigación. Gabriel, gracias por tu constante invitación a conocer la vida “fuera de la pecera” y por compartir largas horas de escritorio conmigo; hicimos un gran equipo y nunca me cansaré de agradecerte por darme de tu tiempo y paciencia para poder escribir las historias generadas de este proyecto.

A los miembros del jurado, los Dres. Ma. Teresa Tusie, Federico Bermúdez, Ofir Picazo y Carlos Aguilar Salinas, quienes invirtieron su tiempo en analizar este trabajo y aportar valiosos comentarios para mejorarlo y completarlo.

Muy especialmente agradezco a la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta y a todo su equipo de trabajo (Lety, Manola, Cecilia, Hiram, David, Ivette, Argelia, César, Leo, Lupita) por permitirme aprender de su experiencia en el laboratorio y dejarme ser parte de ese valioso grupo. Gracias por su amistad, hospitalidad y profesionalismo. ¡Ser parte de ustedes ha sido un privilegio!

A mis compañeros y amigos del laboratorio, que aunque después me hicieron falta, provocaron que la vida en el IFC fuera mucho más divertida. A Candy, Avril, Josué, Isui, Yexel y Andrea por dejar su huella en el AL-203 y en mi historia. A mis amigos de laboratorios “vecinos”: a Nadia, que siempre tenía algo bueno que contar; a Christian por los buenos ratos, las películas, las risas y las reflexiones. El doctorado no hubiera sido lo mismo sin ustedes. A los que llegaron “después” a nuestro laboratorio: Eli, Diana, Oscar, Heroldo, Alejandra, Rebeca, Elvia, Luis. Gracias por traer nuevos bríos a este lugar!

A mis tíos cuya herencia científica sin duda ha dejado huella en la familia. A la Dra. Elizabeth Solleiro, por motivarme con su propia historia a terminar este doctorado. A mi tío, el Dr. José Luis Solleiro por darme ejemplo de un científico que no se conforma y abrirme los ojos a nuevos horizontes.

A la Dra. Isabel Saad, por enseñarme con su generosidad y perseverancia que los Biólogos también podemos hacer cosas de gran calidad en el ámbito empresarial. Al equipo de “Biorremedia”: el Dr. Manuel Jiménez, al M. en C. Luis Robledo y a los Biólogos Jorge Castillo y Diana Young por confiar que juntos podemos llegar más alto.

# AGRADECIMIENTOS DEL ALMA

A Orlando, puesto que el doctorado vino acompañado de grandes sorpresas, entre ellas la hermosa oportunidad de conocerte, de comprometernos, de casarnos e iniciar nuestra vida juntos, de construir nuestra casa y de saborear la delicia de ser padres. No me canso de decir que eres el mejor compañero en este viaje pues, sin duda alguna, tu apoyo, comprensión y amor incondicional han sido ingredientes esenciales para poder llevar a cabo cada reto que tengo enfrente. Amor, mis logros también son tuyos. Sigo y seguiré enamorada de ti.

A mis hijos: Isaac y el bebé que está en camino, gracias por la alegría que han significado para nuestra familia y por ser un motor tan importante para ser mejor cada día. Su llegada a mi vida ha sido el regalo más grande que el cielo me haya podido otorgar. Este doctorado también es para ustedes, para que sepan que formas parte de un linaje que no se rinde, sino que se esfuerza por seguir escalando y llegar hasta la meta, siempre con la ayuda de Dios.

A mi Mamá y Luis, nunca me cansaré de agradecerles el apoyo emocional y económico que me dieron para poderme sentar a terminar esta tesis. Mamá, gracias por el legado de perseverancia que has dejado en mí. Gracias por todo tu apoyo y amor, pero sobre todo por insistir en que llegara a la meta en este posgrado. Por eso, este doctorado también tiene tu sello. Gracias porque no sólo eres un gran ejemplo a seguir, sino ahora, mi mejor amiga. Luis, creo que no podría encontrar otro corazón más noble, pues sin ser mi papá “carnal” me has enseñado las cosas que en esta vida más uso y más disfruto: nadar, jugar cartas, manejar, correr, negociar, viajar... Gracias por compartirme tanto amor durante todos estos años.

A mi Papá y Merce, gracias por todo el amor que me han dado, pues ha sido una semilla invaluable de fortaleza para mí. Papá, tus abrazos y cuidados siempre serán para mí un refugio que me llena de aliento para seguir enfrentando los retos en esta vida. Me siento orgullosa de llevar parte de tu naturaleza dentro de mí. Merce, gracias por tus cuidados, tu cariño, tu generosidad y tus porras. Te agradezco desde el fondo de mi corazón el ser esa “otra mamá” que ha estado a mi lado durante tantos años de mi vida de manera incondicional.

A mis hermanos (Omar, Melissa, Beto, Gonzo, Javi), gracias por su cariño, por su compañía, por sus ocurrencias, porque aprendo de ustedes, de sus diferencias... Por darme a mis sobrinos, que son de los regalos más hermosos que tengo... Gracias porque mi vida se complementa por tenerlos cerca de mí. Especialmente a Javi, por su ayuda en la última etapa de mis experimentos, esperando que esta experiencia lo haya motivado a adentrarse en el campo de las neurociencias y continúe con la tradición científica de la familia.

A mis compañeras de vida (Gloriamar, Yessi, Aideé, Tanya, Pili, Iris y Mine) porque en distintos momentos (infancia, adolescencia y la Facultad) han sido las mejores amigas. Gracias porque cuando estoy con ustedes parece que el tiempo no pasa y su cariño me demuestra que la amistad no tiene barreras de tiempo, ni de espacio.

A mi familia de CSR, mis "Amiwis" (en estricto orden ortográfico: Adri, Clau, Dona, Gabach, Luchi, Marian, Nay, Schatz, Sil, Yux) por los muchos años de compartir las risas y las lágrimas. Gracias por ser esas hermanas que han estado conmigo en todo momento y porque a pesar de conocerme tal cual soy me siguen amando... Gracias porque después de crecer juntas y regalarme la mejor juventud y adolescencia que pude haber tenido, hoy compartimos nuestra vida de esposas y madres. Gracias por dejarme aprender de ustedes constantemente. Tenerlas en mi vida es un regalo invaluable e inmerecido!!!

A mis "pupilos" de las distintas etapas en CSR (Andrea, Anita, Alex, Arlen, Chris, Dianitas, Edne, Fabi, Irving, Jahaz, Jaquie, Jessi, Karlitas, Lucerin, Lesly, Mel, Moni, Omar, Perla, Quique, Rocío, Rosita, Vianey) simplemente porque durante ya casi 20 años, lejos o cerca, hemos formamos "otra gran familia" de la cual he aprendido, con la cual he madurado y me he enriquecido día a día. Estoy plenamente agradecida porque sean parte de mi historia, pues a pesar de mis fallas, ustedes han sido una gran motivación para tratar de que mi fe y mis acciones sean congruentes. A donde quiera que vayan mi corazón está con ustedes.

Finalmente y no por eso menos importantes, a mis muy estimados Alejandro y Rosi Orozco, Lety Salgado, Víctor y Ari Valenzuela, Ofir y Oli González, Eduardo y Lety Flores, Ricardo y Raquel Pineda y Jorge y Olivia Pérez por tantos años de ejemplo, lucha y perseverancia. Gracias por creer en mí y porque en distintas etapas de mi vida con sus oraciones, consejos y palabras de aliento han dejado una huella imborrable que me ha permitido tener fuerzas donde no las había y formar en mi mucho de lo que hoy soy. Su vida ha sido de gran inspiración para mí. Gracias!!!

## **1.Introducción**

**Diabetes - 1**

**Síndrome Metabólico - 2**

**Modelos animales de diabetes y Síndrome Metabólico - 3**

**El miedo y la ansiedad - 8**

**Definición de conceptos - 8**

**Modelos animales del miedo y la ansiedad - 8**

**Respuestas fisiológicas en condiciones de miedo y ansiedad - 10**

**Ansiedad en la clínica y clasificación de los trastornos de ansiedad - 12**

**El papel de la amígdala en el procesamiento del miedo y la ansiedad - 13**

**Procesamiento de las conductas de miedo y ansiedad - 14**

**Anatomía de la amígdala - 17**

**Mecanismos de neurotransmisión dentro de la amígdala - 20**

**Generalidades del sistema de neurotransmisión dopaminérgico - 20**

**El sistema dopaminérgico en la amígdala y su papel en la modulación del miedo y la ansiedad - 24**

**Relación Amígdala, Dopamina y Ansiedad - 27**

**La relación diabetes-ansiedad - 29**

**La relación síndrome metabólico y ansiedad - 31**

**Mecanismos relacionados con el incremento de ansiedad en los individuos diabéticos - 32**

## **2.Justificación, Hipótesis y Objetivos - 40**

## **3.Metodología - 43**

**Modelos animales de diabetes y Síndrome Metabólico - 43**

**Pruebas conductuales - 44**

**Inyección intra-admigdalina de SCH23390 antagonista de receptores D1 - 45**

**Análisis estadístico - 45**

## **4.Resultados**

**Animales tratados con estreptozotocina - 46**

**Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la glucemia, el peso corporal y el consumo de agua y alimento - 46**

**Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la conducta de la rata en el laberinto elevado en forma de "+" (EPM) - 46**

**Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la conducta de la rata en la prueba de campo abierto - 47**

**Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la conducta de la rata en la prueba del enterramiento defensivo - 48**



**Inyección intra-admigdalina de SCH23390, en animales tratados con estreptozotocina - 49**

**Animales sometidos a alimentación hipercalórica (solución de sacarosa al 20%) - 52**

**Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la glucemia y otros parámetros - 52**

**Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la conducta de la rata en la prueba de laberinto elevado en forma de "+" (EPM) - 53**

**Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la conducta de la rata en la prueba de campo abierto - 55**

**Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la conducta de la rata en la prueba del enterramiento defensivo - 56**

## **5. Discusión**

**Animales tratados con estreptozotocina - 57**

**Inyección intraamigdalina de SCH23390 en animales tratados con estreptozotocina - 60**

**Animales sometidos a alimentación hipercalórica - 63**

## **6. Conclusiones y Perspectivas - 64**

## **7. Referencias - 69**

## **8. Anexos - 83**

**Anexo 1: Características de las cepas espontáneamente diabéticas como modelos murinos de diabetes mellitus tipo 1 y 2- 83**

**Anexo 2: Pruebas conductuales - 85**

**Anexo 3: Inyección intra-admigdalina de SCH23390 antagonista de receptores D1 - 88**

**Anexo 4: Tablas de estudios diabetes-ansiedad en roedores - 91**

**"Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test" [Physiol and Behav. 120(2013): 130-135]**

**"Increased anxiety-like behavior is associated with metabolic syndrome in rats" [Manuscript]**

## RESUMEN

En este trabajo se presentan evidencias de la relación que existe entre dos entidades patológicas de origen metabólico (la diabetes -DM- y el síndrome metabólico -SM-) y una de tipo neurológico: la ansiedad. Las aproximaciones experimentales utilizadas en este estudio para modelar las entidades patológicas metabólicas incluyeron un modelo de DM inducida por estreptozotocina (STZ) y un modelo de SM producido por la ingestión de una dieta hipercalórica (solución de sacarosa al 20%) durante 6 meses. Los paradigmas de ansiedad en los que se evaluaron a los animales experimentales fueron el Laberinto Elevado en forma de "+" (LE+), el campo abierto (CA) y el enterramiento defensivo (ED).

Utilizando el modelo de la STZ pudimos observar cambios conductuales que denotan un perfil ansiogénico en los animales: en el CA, una disminución en el tiempo que el animal pasaba en los cuadros centrales de la arena, así como un incremento en el tiempo que la rata realizaba conductas de congelamiento. De igual manera, en el ED el animal presentó un incremento en el tiempo que pasaba realizando conductas de congelamiento, efecto que fue revertido por la administración bilateral, intra-amigdalina del antagonista selectivo de los receptores tipo D1, el SCH23390. Sorpresivamente, en el LE+ pudimos observar un aumento en el tiempo que el animal pasaba en los brazos abiertos del laberinto, así como en el número de entradas que los animales realizaban a ellos. Este perfil conductual aparentemente "ansiolítico" se comparó con el efecto de la privación de agua por 48 y 72 h en el LE+ demostrando que, tanto los animales privados del vital líquido, como los tratados con STZ presentaban una conducta similar en este paradigma conductual como consecuencia de la sed causada por las manipulaciones experimentales. Este resultado nos permitió discutir la importancia de la condición fisiológica de los animales hiperglucémicos en el momento en que son evaluados en las pruebas de ansiedad, para así evitar interpretaciones equivocadas acerca de la conducta tipo ansiosa de los animales en este tipo de estudios.

Por otro lado, utilizando el modelo de SM (alimentación hipercalórica), observamos que los animales mostraban un perfil ansiogénico en el CA similar al que presentaban los animales tratados con STZ (aumento en el tiempo de congelamiento y disminución del tiempo en los cuadros centrales), mientras que en el ED se observó un incremento en el porcentaje de tiempo que el animal pasaba realizando conductas de enterramiento. En contraste, en el LE+ no se observaron cambios significativos en el grupo experimental, efecto que ocurrió muy probablemente a causa de un "efecto de techo", dado que bajo nuestras condiciones de estudio, un porcentaje considerable de animales del grupo control (44.4%) nunca exploraron los brazos abiertos del LE+.

Las observaciones obtenidas en este estudio nos permiten concluir, como ha sido sugerido por otros autores, que tanto en la DM, como en el de SM, existe una relación estrecha entre estos desórdenes metabólicos y la ansiedad. Nuestros resultados también permiten sugerir que existen condiciones fisiológicas y metodológicas en las que el LE+, a pesar de su popularidad en la literatura, no es una herramienta de estudio adecuada para determinar efectos ansiogénicos en este tipo de estudios, o en aquellos donde se estudien animales con una acentuada polidipsia.

Aunque se requieren de estudios posteriores para conocer la naturaleza de los mecanismos que subyacen a esta relación, los resultados obtenidos en nuestros experimentos de microinyección intraamigdalina apuntan a la participación de los receptores de tipo D1 presentes en el complejo amigdalino en el incremento de ansiedad observado en los animales tratados con STZ. La observación anterior abre la posibilidad de que el bloqueo de estos receptores pueda ser usado como una alternativa terapéutica novedosa en el incremento de ansiedad de los pacientes diabéticos y/o con síndrome metabólico.

# ABSTRACT

In this study we show evidence of an association between diabetes and/or metabolic syndrome and anxiety. The experimental approximations used to study this relationship were the streptozotocin (STZ)-induced diabetes model and a chronic high- carbohydrate diet (20% sucrose in drinking water). The paradigms of anxiety utilized included the Elevated-Plus Maze (EPM), the Open Field Test (OFT) and the Shock-Probe/Burying Test (SPBT).

Using the STZ-induced diabetic model, we observed behavioral changes that indicate an anxiogenic profile in diabetic subjects, such as a reduction in time spent in the central squares and an increase in the time spent in freezing behavior in the OFT. Moreover, in the SPBT we also observed an increase in the percentage of time spent in freezing behavior, which was reverted by the injection of SCH3390 (a selective D1 antagonist) within the amygdala. Surprisingly, we have anxiolytic outcomes when diabetic rats were evaluated in the EPM: the time spent in the open arms of the maze and the percentage of entries to these spaces were augmented. This anxiolytic profile was compared with the behavior of rats which were water-deprived for 42 of 78 h in this anxiety paradigm. We demonstrated that similar effects were produced by water deprivation and STZ-induced diabetes in the behavioral exploration in the EPM, indicating that experimental observations can be misleading when studying physiological or pathological conditions, e.g. diabetes, in which thirst may increase exploratory behavior.

The sucrose-treated rats showed both avoidance to explore the central part of the arena and a significant increase in freezing behavior in the OFT. In addition, these animals displayed an increase in burying behavior in the SPBT. However, within the EPM we did not find statistical changes among groups, effect which may have arise as a consequence of a “sealing effect”, since under our experimental conditions a considerable percentage of animals within the control group (44%) did not explore the open arms of the maze at all.

Our results confirm, as other authors have suggested previously, that there exist a close relationship between both, diabetes and metabolic syndrome, and anxiety. Moreover, this report demonstrate that even though the EPM is a popular tool used to study this relationship, is not an adequate test to study anxiety-like behavior in diabetic rodents, with metabolic syndrome or other conditions that provoke polydipsia.

More studies are necessary to investigate the nature of the mechanisms that provoke the increase in anxiety observed in our animals. However, our results obtained with the microinjection of SCH23390 within the amygdala suggest that amygdaloid D1 receptors play a role in the modulation of anxiety-like behavior in diabetic subjects. This opens up the possibility that blockade of amygdaloid dopamine D1 receptors may be used as therapeutic alternative for the control of the increased anxiety observed in diabetic patients and/or with metabolic syndrome.

# 1. INTRODUCCIÓN

## Diabetes

Se define como diabetes mellitus (DM) a un síndrome que comprende un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos en los que el factor común es la hiperglucemia (alta concentración de glucosa en la sangre), el cual se sostiene de forma crónica en los pacientes. Esta característica es consecuencia de la falta o disminución en los niveles de insulina o de una resistencia periférica a su acción.

La etiología de la diabetes es multifactorial, presentando un componente genético y otro del medio ambiente. Existen dos tipos principales de DM: la tipo 1 (DM1) es de origen autoinmune y es provocada por un ataque de células linfocíticas efectoras y macrófagos del sistema inmunológico a las células pancreáticas de tipo  $\beta$ , las cuales son las responsables de sintetizar la insulina –la hormona responsable de aumentar el transporte de glucosa a las células diana-. Este tipo de diabetes, denominada también diabetes juvenil o diabetes dependiente de insulina, representa solamente el 10% de los casos clínicos. Hoy día se conocen al menos 20 genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que se han implicado en la DM1. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de anticuerpos contra proteínas propias del organismo, tales como la insulina, la glutamato descarboxilasa (GAD) y la fosfatasa de tirosina ICA512 (también conocida como IA-2) [Chatziegeorgiou et al., 2009].

La DM tipo 2 (DM2) –llamada también diabetes del adulto o no dependiente de insulina-, se trata de un desorden metabólico que ocurre en el organismo a consecuencia de su incapacidad para utilizar y producir adecuadamente la insulina. Ésta representa el 90% de los casos clínicos y, por lo tanto, es la que ha adquirido proporciones epidémicas en nuestros tiempos. Los problemas metabólicos que generan la DM2 comienzan a producirse años antes de que esta patología se manifieste de forma clínica. Se desarrolla por la conjunción de un componente poligénico y otro del medio ambiente, que puede incluir, la obesidad por una mala alimentación, un estilo de vida sedentario y el estrés [Chatziegeorgiou et al., 2009]. La resistencia a las acciones periféricas de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos es una señal importante para el desarrollo de la diabetes, condiciones que se presentan en el síndrome metabólico (ver más adelante). En él las células  $\beta$  son estimuladas continuamente para secretar altas cantidades de insulina. Eventualmente, éstas llegan a agotarse y son incapaces de producir la cantidad de hormona necesaria para mantener los niveles de glucosa en condiciones normales, de ahí que se comience a desarrollar hiperglucemia [Larqué et al., 2011]. La DM2 está entre las primeras cinco causas de muerte en nuestro país [Organización Panamericana de la Salud, 2007] y es uno de los padecimientos que demanda un alto gasto público en México en la actualidad [Arredondo y Zúñiga, 2004]; de ahí que la investigación en torno a esta enfermedad sea hoy una actividad intensa en muchos grupos científicos alrededor del mundo, incluyendo el nuestro.

## Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico (SM) es se trata de un complejo de signos que aumentan el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes y algunos tipos de cáncer. Fue descrito por primera vez por Kylin en la década de los 20's como una entidad que agrupaba a la hipertensión, la hiperglucemia y la gota. Dos décadas después el trabajo de Vague permitió determinar que la obesidad de tipo androide (aquella que se caracteriza por el "ensanchamiento" de la parte superior del cuerpo) era uno de los rasgos más estrechamente asociados a las anormalidades metabólicas observadas en la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. En 1988 Reaven acuñó el término "síndrome X" para describir al conjunto de las alteraciones previamente mencionadas; sin embargo, la obesidad no estaba incluida en su definición. Un año más tarde, Kaplan renombró el término de Reaven como "el cuarteto de la muerte", mientras que otros lo llamaron "síndrome de resistencia a la insulina" [ver la revisión de Alberti et al., 2006]. Actualmente se conoce al SM como una constelación de factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y la DM2 relacionados con componentes lipídicos y no lipídicos, que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un individuo como manifestaciones de un estado de resistencia a la insulina, cuyo origen puede ser genético y/o ambiental.

En 1998 la Organización Mundial de la Salud definió a este conjunto de padecimientos como la coexistencia en un mismo individuo de 3 de los siguientes elementos [basado en la revisión de Day, et al., 2007]:

- 1) Resistencia a la Insulina o Glucosa en ayuno alterada ( $\geq 110$  mg/dL) o Prueba de Tolerancia a la Glucosa alterada ( $\geq 140$  mg/dL/2h).
- 2) Dos criterios adicionales, elegidos de la siguiente lista:
  - Obesidad central (considerada en hombres cuando el perímetro de la cintura es  $>102$  cm y  $>88$  cm en mujeres ), o un índice de masa corporal de  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>
  - Hipertensión arterial ( $\geq 140/90$  mmHg)
  - Dislipidemia (Triglicéridos en niveles  $\geq 150$  mg/dL y HDL-C  $<35$  md/dL en hombres y  $<39$  mg/dL en mujeres)
  - Presencia de microalbuminuria (excreción de albúmina por la orina  $\geq 20$   $\mu$ g/min, índice utilizado como marcador de disfunción endotelial, daño vascular o renal y enfermedad cardiovascular).

Otras definiciones de SM, como la del National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel III), consideran que los criterios diagnósticos deben excluir la presencia de la resistencia a la insulina y le da mayor peso al contenido de tejido adiposo acumulado y se basa en la asociación de 3 de los siguientes factores enlistados:

- Glucosa en ayuno alterada ( $\geq 110$  mg/dL) o Prueba de Tolerancia a la Glucosa alterada ( $\geq 140$  mg/dL/2h)
- Obesidad central ( $> 102$  cm en hombres, 88 cm en mujeres)
- Índice de masa corporal de  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>
- Hipertensión arterial ( $\geq 130/85$  mmHg)
- Dislipidemia (Triglicéridos en niveles  $\geq 150$  mg/dL y HDL-C  $< 40$  mg/dL en hombres y  $< 50$  mg/dL en mujeres)

Aunque la discusión para definir al SM es controversial, es bien aceptado que el SM al igual que la DM2, son problemas de salud pública importantes. En el país se informó una alta prevalencia de SM en poblaciones urbanas entre los años 2004-2010 (desde el 21.4 hasta un 27.6%) [Aguilar-Salinas et al. 2004; Echavarría-Pinto et al., 2006]. Valores parecidos se han encontrado en los Estados Unidos [Beltrán-Sánchez et al., 2013].

Como consecuencia del desarrollo de SM se generan también otras alteraciones en el organismo, como pueden ser el desarrollo de hígado graso, anormalidades en la función del tejido graso y el tracto gastrointestinal, inflamación sistémica, falta de fertilidad, entre otras. De hecho, existen una serie de condiciones clínicas que han sido asociadas al SM por ejemplo el síndrome de ovario poliquístico, la Enfermedad de Alzheimer y algunos tipos de cáncer, como el de pulmón, próstata y páncreas [Aydin et al., 2014].

Por los motivos mencionados previamente hoy es de crucial importancia entender los mecanismos que lo producen, para poder tratarlo y prevenirlo de una mejor forma, de ahí que el SM sea también es un objeto de estudio prioritario en muchos grupos de investigación no sólo en México, sino alrededor del mundo.

### **Modelos animales de diabetes y síndrome metabólico**

En un esfuerzo por entender la etiopatología tanto de la DM, como del SM, y poder diseñar tratamientos adecuados para quienes los padecen, se han desarrollado distintos modelos animales que reproducen uno o más de los síntomas que caracterizan dichas patologías. Sin embargo, las comparaciones entre ellos y la condición clínica del humano aún no se consiguen de forma completa y exitosa. Es importante mencionar que algunos de estos modelos comparten rasgos de la etiopatología de ambas entidades y en la literatura pueden manejarse en ocasiones de forma indistinta como modelos de DM y/o de SM.

De manera general, podemos clasificar los modelos animales de DM y SM en 5 grupos [basado en las revisiones de Rees y Alcolado, 2005 y Chatzigeorgiou et al., 2009]:



- 1) Quirúrgicos:** se trata de una técnica invasiva, donde se remueve total o parcialmente el páncreas, produciendo una condición hiperglucémica en los animales. Este procedimiento se ha llevado a cabo en perros, cerdos, gatos, roedores y primates debido a la falta de espontaneidad para desarrollar una condición similar a la DM1 en estas especies; ha sido muy utilizado por la facilidad para realizarse en el laboratorio. Sin embargo, afecta la fisiología de los animales severamente y, por lo tanto, los resultados obtenidos con este modelo pueden ser difíciles de interpretar.
  
- 2) Farmacológicos:** los animales (generalmente roedores) son administrados con compuestos químicos que destruyen específicamente las células  $\beta$  del páncreas, simulando así la destrucción de éstas en la DM1. Fármacos como la estreptozotocina (STZ), la aloxana, el vacor, entre otros, han sido utilizados para inducir una condición hiperglucémica severa en los animales, además de otros rasgos característicos de la DM, como polidipsia, polifagia y poliuria. En algunos trabajos, la administración de STZ se lleva a cabo 15 minutos posteriores a la administración de otro compuesto denominado Nicotinamida para modelar a la DM2, puesto que éste protege al organismo de los efectos citotóxicos de la STZ y de la aloxana y, por lo tanto, se desarrolla una hiperglucemia moderada sin cambios en los niveles de insulina plasmática [Masiello et al., 1998]. En este trabajo, el compuesto utilizado para generar una condición hiperglucémica en nuestros animales experimentales fue la STZ, un antibiótico obtenido del hongo *Streptomyces achromogenes* que posee propiedades antitumorales y oncogénicas. Su acción citotóxica sobre las células  $\beta$  es específica, rápida y aparente desde la primera hora posterior a su administración; por sus propiedades alquilantes causa la fragmentación del ADN resultando en necrosis celular irreversible. Entre los compuestos “diabetogénicos” más utilizados se encuentran la aloxana y la STZ. La STZ es la más utilizada en la literatura, pues brinda ventajas sobre la aloxana, debido a que tiene una vida media más prolongada que éste y los efectos hiperglucémicos que produce son de mayor duración, además de que se establecen mejor las complicaciones diabéticas y la posibilidad de provocar cetosis y/o mortalidad es mucho menor. El uso de estos modelos es muy común alrededor del mundo en los distintos grupos de investigación dedicados al estudio de la diabetes, debido a la facilidad para llevarlo a cabo en el laboratorio y por su costo relativamente bajo. Son utilizados principalmente en el estudio de los eventos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que ocurren durante y después de un evento diabético, así como para indagar en los mecanismos que producen las complicaciones diabéticas. A pesar de su popularidad y su relativa “sencillez” para utilizarlos, tienen la limitante de que en algunos casos, este tipo de compuestos son tan tóxicos que pueden generar alteraciones patológicas en otros órganos (riñones, glándulas suprarrenales, tiroides, hipófisis e hígado), además de que no desarrollan ninguno de los mecanismos autoinmunes presentes en la DM1 del humano.
  
- 3) Animales genéticamente modificados:** se trata de animales que presentan mutaciones puntuales en uno o varios genes de interés, o de individuos en los que de manera artificial se inserta en el genoma una construcción de ADN que provoca una pérdida o sobre-expresión de un gen determinado. La variedad de este tipo de animales con rasgos semejantes al SM (resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hipertensión,

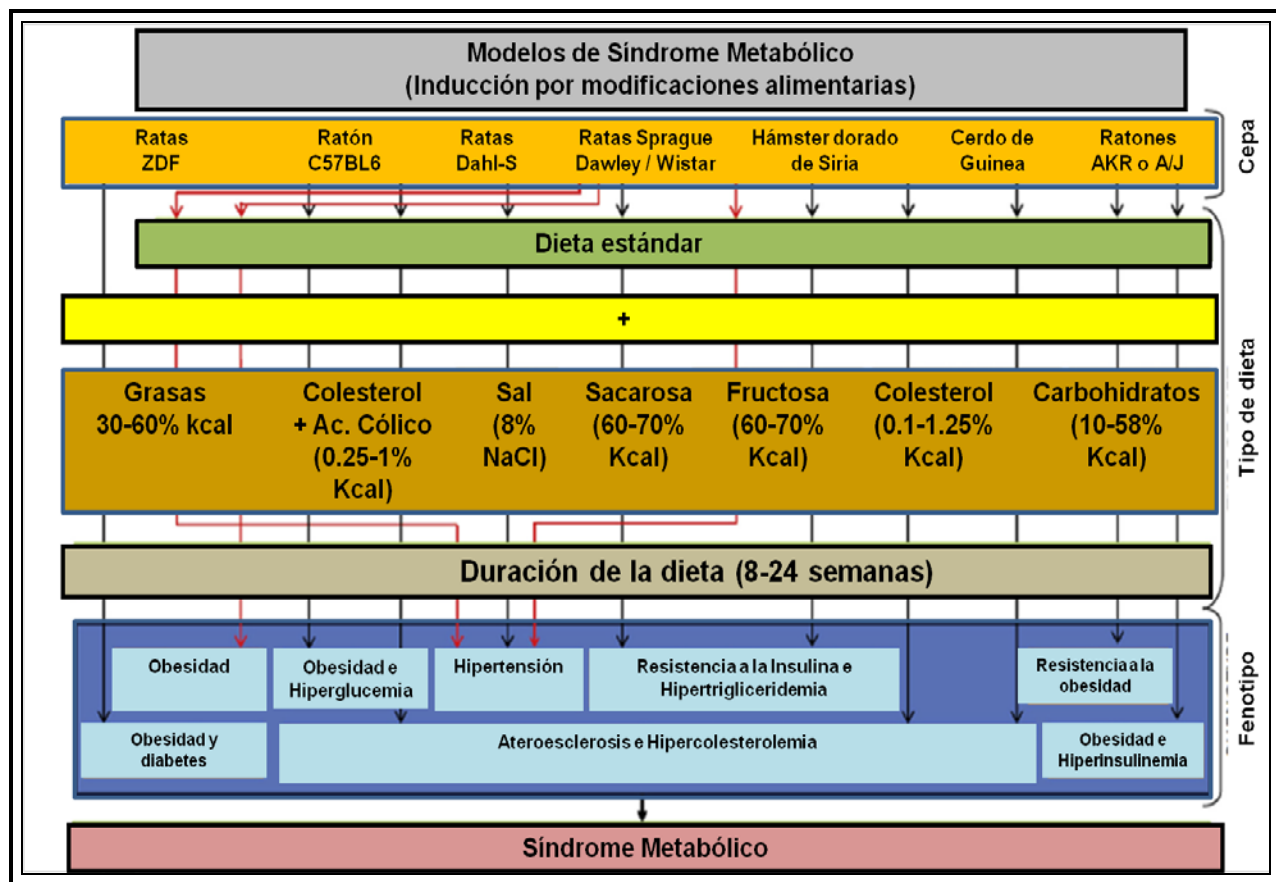
obesidad, entre otros) y posteriormente un fenotipo similar a la DM2 (hiperglucemia) es cada vez más amplia. Un ejemplo de ellos son los ratones BAPa, IA-2/IA-2 $\beta$ , mencionados en el anexo 4 de este trabajo. Estos modelos han sido de gran utilidad para entender el papel de ciertas moléculas específicas en los aspectos de la patogénesis del SM y la DM2, debido a que permiten la interrupción selectiva de la expresión de un elemento genético que forma parte de un sistema mucho más complejo. Las limitantes de este tipo de animales es que la información que se genera con ellos puede llegar a ser limitada, ya que están modificados genéticamente, aunque brindan la oportunidad de estudiar acerca de los mecanismos que generan la DM y/o las alteraciones que provoca una vez establecida.

**4) Cepas espontáneamente diabéticas:** se trata de cepas de roedores que desarrollan espontáneamente síntomas similares a la DM1 o 2 del humano. Estos animales son el resultado de la cruce en laboratorio de varias generaciones y son seleccionados por una o más de las alteraciones metabólicas que estos presentan, como pueden ser la insulinopenia, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad, etc. Algunos ejemplos de este tipo de cepas que modelan a la DM1 son los ratones NOD, así como las ratas Biobreeding y LETL. Aquellas cepas que modelan a la DM2 en ratones son: *ob/ob*, *db/db*, KKK, NSY, NZO, mientras que en ratas se encuentran las ratas obesas tipo Zucker (o *fa/fa*), OLETF y Goto-Kakizaki. Cabe mencionar que algunas de las cepas que modelan a la DM2 han sido consideradas también como modelos de SM por algunos autores, tal es el caso de los ratones *ob/ob*, *db/db* y las ratas tipo OLETF, *fa/fa* y las Goto-Kakizaki [Larqué et al., 2011]. Las características de cada una de estas cepas se encuentran mencionadas con detalle en el anexo 1 de este trabajo. Estas cepas, al igual que los animales genéticamente modificados, suelen ser muy costosas y su mantenimiento es muy complicado, debido a que deben mantenerse en un ambiente libre de patógenos por su alta susceptibilidad a ellos, por lo que su uso en los distintos grupos de investigación es más restringido. Sin embargo, aportan información muy valiosa respecto a los mecanismos etiopatológicos de estas enfermedades.

**5) Modificaciones alimentarias:** estos modelos incluyen aquellos donde se administra de forma crónica alimentos ricos en grasas y/o carbohidratos y/o sal en la dieta de los animales [Aydin et al. 2014]. Con el transcurso del tiempo, esta manipulación experimental produce obesidad y, posteriormente condiciones semejantes a las alteraciones observadas en el SM y posteriormente, a la DM2 del humano (ver figura 1). Dado que la obesidad es el principal factor predisponente para desarrollar DM2, la habilidad para que en un modelo se produzca este rasgo, es crucial para seleccionarlo como modelo de DM2.

Una manera de llevar a cabo esto en el laboratorio es administrando una solución de sacarosa al 20% en el agua de bebida por 2-6 meses, a libre demanda. Los animales manipulados de esta forma desarrollan desde los 2 meses síndrome metabólico, caracterizado por, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, acompañada de obesidad central e hipertensión arterial [Larqué et al., 2011]. Después de 6 meses, además de las características anteriores, las ratas presentan una hiperglucemia moderada [Velasco, et al., 2012]. Este

modelo ha sido de particular interés en nuestro grupo, puesto que en las últimas décadas el consumo de bebidas endulzadas ha sido relacionado con el desarrollo de SM y DM2 [Aydin et al., 2014]. Además, el análisis de los cambios metabólicos que ocurren a corto, mediano o largo plazo a causa de las modificaciones alimentarias es interesante, puesto que el SM usualmente inicia con un incremento en la ingesta de alimentos. Este tipo de modelos es muy valioso debido a que estos animales no presentan una susceptibilidad genética a desarrollar SM o DM2. Esto nos permite discernir el efecto fisiológico de la dieta sobre la génesis del SM de forma más nítida que haciendo uso de los modelos donde existe un trasfondo genético (animales transgénicos y cepas espontáneamente diabéticas).



**Figura 1. Modelos animales de síndrome metabólico inducidos por modificaciones alimentarias**

[Tomado y modificado de Aydin et al., 2014]

Sin lugar a dudas, existen diferencias entre los modelos animales de estos padecimientos y las características patofisiológicas que se presentan en el humano, ya sea porque no logran reproducir todos los síntomas de éstos o porque las características propias de la especie con la que se trabaja hacen que éstas se comporten de distinta forma a la de la evolución clínica en el humano [Chatzigeorgiou et al., 2009]. Por ejemplo, en la mayoría de los modelos murinos de DM ésta se desarrolla sin mostrar la patología en los islotes pancreáticos que caracteriza a la DM del humano (i.e., amiloidosis) [Cefalu, 2006]. Algunas de estas diferencias son tan profundas que algunos autores pueden apuntar que la información que se obtiene a través del uso de estos modelos es inválida. Sin embargo, estas cuestiones pueden ser compensadas cuando los investigadores tienen en mente que cada modelo refleja sólo algunas o fasetas de dichos padecimientos y, por ello, los resultados obtenidos en la experimentación básica deben ser tomados con cautela. Así, resulta ideal trabajar con diferentes modelos para poder entender distintos aspectos de estas patologías [Chatzigeorgiou et al., 2009].

A pesar de las limitaciones anteriormente mencionadas, la utilidad de los modelos animales para avanzar en el entendimiento de los mecanismos etiopatológicos de la DM y el SM es incuestionable. Gracias a algunas de estas aproximaciones experimentales Banting y Best, ganadores del premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1923, pudieron conocer que las características clínicas de la diabetes podían ser reversibles cuando “un extracto obtenido del páncreas” era administrado a perros pancreatomizados, observación que llevó al descubrimiento de la insulina.

Por los motivos anteriores y para los fines de esta tesis, se acepta que estos animales se consideren diabéticos tipo 1 -en el caso de los animales tratados con STZ- y con una condición de síndrome metabólico establecida -en el caso de las ratas alimentadas con la solución de sacarosa.

## El miedo y la ansiedad

La ansiedad puede definirse como una respuesta adaptativa, que alerta y prepara a un individuo a contender contra un peligro potencial o real. Clínicamente, se considera un trastorno mental que se caracteriza por un estado de aprensión profunda, acompañado de algunas respuestas fisiológicas, como cambios en la frecuencia cardiaca, presión arterial, sudoración, sobresalto, malestar estomacal, sensación de asfixia, entre otras. Cuando esta respuesta se presenta en forma prolongada, intensa o frente a estímulos relativamente poco importantes e interfiere con el rendimiento y funcionamiento psíquico y/o social en una persona, se considera patológica [Pérez de la Mora, 2003].

Conceptualmente, la ansiedad puede confundirse con otros fenómenos parecidos a ella, como son el miedo y el estrés. Ciertamente, aunque dichas entidades comparten similitudes en las manifestaciones fisiológicas, endócrinas y/o conductuales que producen, se diferencian entre sí debido a que el miedo ocurre ante situaciones u objetos claramente definidos y que implican un peligro real para el individuo (como la presencia de un depredador), mientras que en la ansiedad o el estrés el estímulo que genera esta condición no está bien definido, por lo tanto se presenta ante una amenaza vaga o difusa, que puede incluso no ser real. Por su parte, el estrés se diferencia de la ansiedad en la duración y/o frecuencia del episodio apremiante que experimenta el sujeto, ya que en el caso de la ansiedad esta puede presentar ante una breve exposición a un estímulo amenazante, mientras que el estrés sería la respuesta a una serie de exposiciones a ese mismo factor [Flores-Gracia, 2005; Gallegos-Cari, 2010].

A pesar de sus diferencias conceptuales, el miedo, la ansiedad y el estrés generan respuestas muy similares tanto en humanos como en otros mamíferos y parecen ser variantes de un mismo mecanismo de alerta que protege a los organismos [Pérez de la Mora, 2007]. Por lo tanto, debido a la dificultad de diferenciar entre dichas entidades, en este trabajo dichos conceptos se manejarán como sinónimos.

## Modelos animales de ansiedad

Por razones éticas que impiden la experimentación en humanos y debido a que la ansiedad es un tema complejo que aún tiene muchas facetas por estudiar, se han desarrollado modelos animales de este trastorno. Dichos modelos permiten someter a los individuos estudiados (generalmente roedores) a distintas manipulaciones experimentales, que generan analogías con lo que ocurre en el humano. Sin embargo, para que un modelo sea válido, tiene que cumplir con los siguientes requisitos (basado en Belzung y Griebel, 2001):

- 1) **Ser predictivo**, es decir, que sea sensible a agentes farmacológicos que son efectivos para disminuir la ansiedad en la clínica.

- 2) **Ser sintomatológico**, lo que se refiere a que debe producir respuestas de miedo y ansiedad similares a las observadas en el humano.
- 3) **Ser inducido**, el término hace referencia a que el estímulo que se aplique a la condición experimental debe ser capaz de producir una amenaza a la homeostasis del organismo estudiado.

Así, los modelos animales de miedo y ansiedad se basan en la capacidad de los organismos para responder ante un estímulo que es potencialmente peligroso ante el cual reaccionan de manera activa (incrementando su locomoción, por ejemplo), o de manera pasiva (con conductas de congelamiento o evitando la fuente del estímulo aversivo).

En general, los modelos animales de ansiedad pueden dividirse en dos grandes grupos: los condicionados y los no-condicionados.

### **Modelos condicionados de ansiedad**

En los modelos condicionados el animal estudiado aprende a reconocer la asociación entre un estímulo inicialmente inofensivo (un sonido o destello luminoso), con uno aversivo (un choque eléctrico, por ejemplo). Tras varias sesiones de entrenamiento, el estímulo inofensivo se transforma en un estímulo condicionado, capaz de desencadenar en el animal respuestas como las que se presentan en la ansiedad (emisión de vocalizaciones de alta frecuencia, congelamiento, inmovilidad, defecación, micción, entre otras) [Pérez de la Mora, 2003].

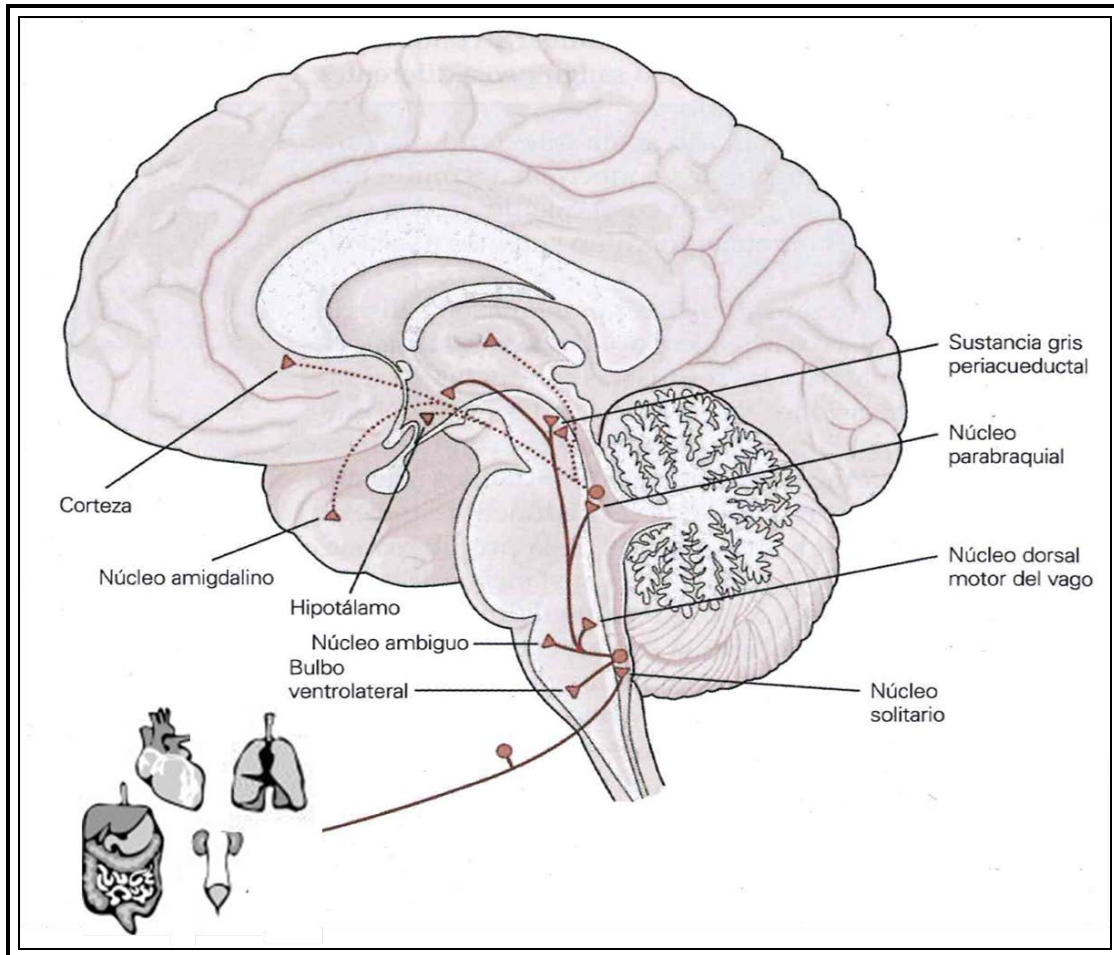
### **Modelos no-condicionados de ansiedad**

En los modelos no-condicionados se explota la tendencia natural de una especie a comportarse de una forma determinada en su ambiente. Reciben este nombre debido a que son de ensayo único y, por lo tanto, no requieren que los animales sean entrenados. Por ejemplo, en el laberinto elevado en forma de “+” (EPM) y el campo abierto (OFT) -unas de las pruebas conductuales de ansiedad más populares en la literatura-, se saca ventaja del miedo innato de los roedores a los espacios abiertos. En la caja luz-obscuridad se aprovecha el miedo de estos animales a los espacios muy iluminados y en el enterramiento defensivo se saca provecho de la conducta innata de los roedores a enterrar “algo” que el animal interpreta como un estímulo adverso (un choque eléctrico, en este caso). Para el estudio de los desórdenes ansiosos, en este trabajo se emplearon este tipo de modelos animales (el EPM, el OFT y el enterramiento defensivo). El procedimiento que se llevó a cabo se con este fin describirá con mayor detalle en la sección de metodología.

## Respuestas fisiológicas en condiciones de miedo y ansiedad

En respuesta a una situación estresante o de peligro existen procesos de afrontamiento dentro del organismo que lo ayudan a “pelear o huir”. Por un lado, el Sistema Nervioso Simpático (SNS) responde liberando abruptamente al torrente sanguíneo adrenalina, una hormona que agudiza los sentidos para permitir una mejor recepción de información del ambiente. Sus efectos son casi inmediatos en los organismos y se manifiestan liberando una gran cantidad de energía que produce taquicardia, taquipnea, aumento de flujo sanguíneo a los músculos para realizar acciones vigorosas, dilata las pupilas, entre otras reacciones. El Sistema Nervioso Parasimpático (SNP) –que generalmente tiene funciones antagónicas a las del SNS- se encarga de restablecer el equilibrio de la energía utilizada en estas situaciones con el fin de restablecer las funciones “normales” del organismo después de dicha respuesta. El nervio vago (un nervio primordialmente autónomo que inerva los músculos lisos y las glándulas de los aparatos digestivo, respiratorio y cardiopulmonar) percibe los cambios provocados en los órganos internos a causa de la situación estresante. Esta información visceral la envía al núcleo del tracto solitario (NTS), un conjunto de estructuras nerviosas finamente interconectadas forma una red autónoma central enviando proyectando sus fibras directamente a las neuronas del SNS y SNP presentes en el bulbo raquídeo y la médula espinal, para mediar los distintos reflejos autónomos y coordinar sus respuestas. La mayoría de estas proyecciones nerviosas llegan al núcleo parabraquial y de ahí se envían al hipotálamo, la sustancia gris periacueductal, el tálamo, la corteza cerebral y el complejo amigdalino (ver figura 2), el cual es el encargado de coordinar la respuesta ansiosa al activar otras regiones cerebrales (ver más adelante). Así, el NTS actúa integrando la función autónoma con las respuestas endócrinas y conductuales del individuo que se presentan en situaciones de amenaza real o potencial.

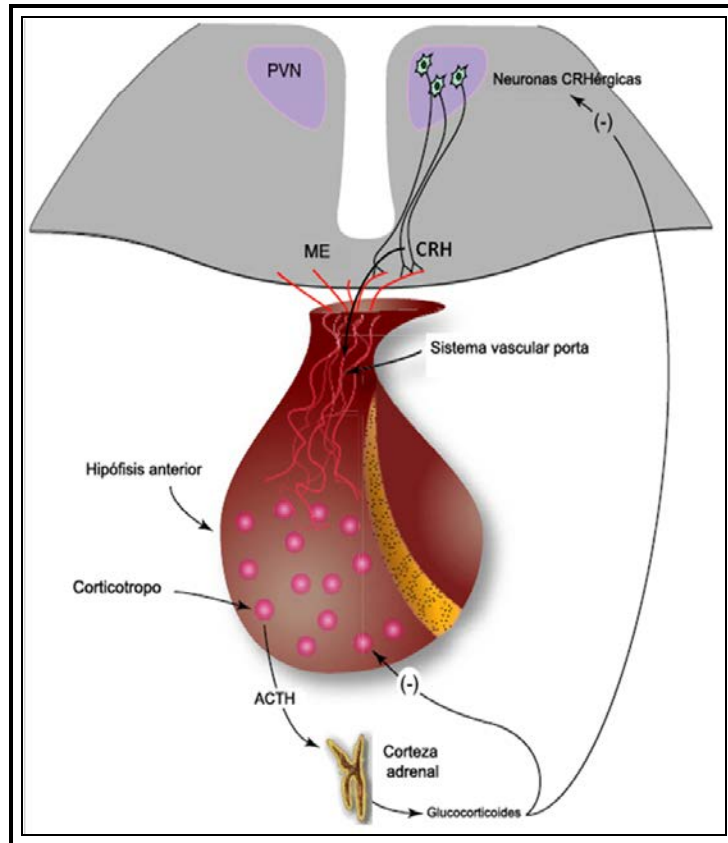
Por otra parte, ante las situaciones estresantes o de peligro el sistema neuroendócrino (eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, HHA; ver figura 3) responde en el hipotálamo liberando una hormona denominada CRH (abreviada así por sus siglas en inglés, Hormona liberadora de Corticotropina) que a su vez estimula en la hipófisis la producción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica), la cual es enviada al torrente sanguíneo y de esa forma se transporta hasta la corteza de las glándulas adrenales para promover la liberación de glucocorticoides (GC, cortisol en humanos y corticosterona (CORT) en roedores). El aumento de GC tiene la capacidad de retroalimentar el sistema negativamente a nivel hipotalámico e hipofisiario e inhibir así su síntesis y liberación [Squire et al., 2003]. Así, el sistema adrenérgico y el eje HHA juegan un papel vital en la adaptación de los seres vivos ante los retos homeostáticos que se presentan en condiciones de ansiedad y han perdurado en el proceso evolutivo, pues confieren ventajas biológicas para su supervivencia [Le Doux, 1996; Heinze, 2003].



**Figura 2. Vías que distribuyen por el encéfalo la información sensitiva visceral.**

La información aferente visceral (línea continua) entra al cerebro a través del núcleo del tracto solitario. Se distribuye a las neuronas preganglionares, a un área del bulbo ventrolateral, que coordina los reflejos autónomos y respiratorios, y a través de una vía ascendente al prosencéfalo. Las entradas menos directas (línea punteada) que hacen relevo en el núcleo parabraquial llevan esta información al hipotálamo, el complejo amigdalino, la corteza y la sustancia gris periacueductal [Tomado de Kandel et al., 2001].





**Figura 3. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.**

[Tomado de Squire, et al., 2003]

### **La ansiedad en la clínica y clasificación de los trastornos de ansiedad**

El diagnóstico clínico de la ansiedad se realiza mediante distintos instrumentos, que han sido desarrollados con el fin de determinar la presencia y severidad de la sintomatología ansiosa. Dichos instrumentos identifican una serie de signos y síntomas de este trastorno, arrojando resultados que se reportan a manera de escalas. Entre las pruebas de diagnóstico clínico de ansiedad y depresión más utilizadas se encuentran la escala de Hamilton (Hamilton Anxiety Scale Rate), el inventario del estado ansioso (STAI, State Trait Anxiety Inventory) y la escala de examinación Minimental (Minimental State Examination Scale).

Clínicamente los trastornos de ansiedad se clasifican según el conjunto de signos y síntomas presentes, su etiología y su frecuencia de aparición y se dividen, de acuerdo al DSM-IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales), en 11 categorías, cuyos nombres y características pueden revisarse en la Tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación de los trastornos de ansiedad según el DSM-IV**

Nombre del trastorno	Características
<b>1.Crisis de angustia o pánico:</b>	aparición súbita de síntomas de aprensión y miedo intenso, acompañado generalmente de una sensación de muerte inminente, de “volverse loco” o perder el control. Durante la crisis aparecen síntomas, como falta de aliento, opresión o malestar torácico, sudoración, entre otras. Puede presentarse con o sin agorafobia.
<b>2.Agorafobia:</b>	es la aparición de ansiedad en lugares o situaciones donde escapar resulta difícil, puede presentarse en un individuo sin antecedentes de crisis de angustia (a lo que se denomina inesperada) o formar parte del historial clínico del paciente.
<b>3.Fobias específicas:</b>	ansiedad que se manifiesta ante la exposición a situaciones u objetos temidos, como el miedo a las arañas, por ejemplo.
<b>4.Fobias sociales:</b>	ansiedad producida como respuesta al miedo a actuar en público o a enfrentar ciertas situaciones sociales.
<b>5.Trastorno obsesivo-compulsivo:</b>	se caracteriza por la existencia de pensamientos persistentes que causan malestar (obsesiones) y en consecuencia, se pueden manifestar comportamientos repetitivos (compulsiones) que se realizan para atenuar el malestar generado.
<b>6.Trastorno por estrés post-traumático:</b>	se produce por la re-experimentación de acontecimientos altamente traumáticos, lo que produce una condición de hiper-vigilancia y evitación de los estímulos relacionados con el trauma.
<b>7.Trastorno por estrés agudo:</b>	se manifiesta un estado parecido al del estrés post-traumático, pero su duración es menor y va de 2 días, hasta 4 semanas.
<b>8.Trastorno por ansiedad generalizada:</b>	ansiedad y preocupación excesiva y persistente durante al menos 6 meses.
<b>9.Trastorno de ansiedad debido a enfermedad médica:</b>	crisis de angustia que se manifiesta como consecuencia fisiológica de una enfermedad subyacente.
<b>10.Trastorno de ansiedad inducido por sustancias:</b>	crisis de angustia generada por la intoxicación o abstinencia de una sustancia química o medicamento, como el alcohol, la cafeína, los sedantes, entre otros.
<b>11.Trastorno de ansiedad no especificado:</b>	se incluye en esta categoría aquellos trastornos que manifiestan ansiedad o fobias que no reúnen los criterios de diagnóstico mencionados en las categorías anteriormente mencionadas.

### **Sustratos anatómicos del miedo y la ansiedad: La amígdala**

En la génesis de la ansiedad participan distintas estructuras cerebrales que conforman al sistema límbico (el responsable de la expresión de las emociones), entre las que destacan la amígdala, una estructura en forma de almendra ubicada en la profundidad del lóbulo temporal que se ha reconocido como el “epicentro de las emociones”.

## **El papel de la amígdala en el procesamiento del miedo y la ansiedad**

Los trabajos publicados por Kluver y Bucy en 1939 arrojaron evidencias de que la amígdala es una región fundamental en la expresión emocional, especialmente en el procesamiento del miedo y la ansiedad. En sus experimentos dichos investigadores observaron que la remoción bilateral del lóbulo temporal en monos Rhesus producía un “aplanamiento emocional”, así como otras conductas anormales, como el aumento en la exploración, la tendencia a examinar los objetos con la boca (oralidad), hipersexualidad, ceguera psíquica (reconocimiento visual atenuado y por tanto, la necesidad de acercarse demasiado a los objetos animados e inanimados) y la desaparición de vocalizaciones asociadas a manifestaciones de miedo y agresividad [Kluver y Bucy, 1939].

Años más tarde, el trabajo de Lawrence Weiskrantz (1956) permitió discernir que la mayoría de las conductas “anormales” observadas en los monos estudiados por Kluver y Bucy se debían principalmente a la remoción bilateral de la amígdala. A partir de estos hallazgos se han llevado a cabo distintos ensayos experimentales para conocer los efectos de la lesión de la amígdala o de su estimulación eléctrica en el miedo y la ansiedad. A través de estos procedimientos se observó que la lesión de esta región provoca una perturbación en la respuesta de condicionamiento al miedo en primates no humanos y humanos [Bechara et al., 1995; La Bar et al. 1995] y que reduce la conducta de congelamiento en ratas expuestas a un gato sedado o al pelo de este animal [Vazdarjanova et al., 2001]. En contraste, cuando la amígdala se estimula eléctricamente, se ha observado que se generan sentimientos de miedo y ansiedad, reacciones autonómicas indicativas de miedo y un aumento en los niveles plasmáticos de ACTH y CORT en la rata [Feldman y Weidenfeld, 1998].

Recientemente, los estudios realizados con técnicas de neuroimagen, como la resonancia magnética funcional (RMf) y la tomografía por emisión de positrones (PET) han corroborado el papel de la amígdala en el procesamiento emocional. Mediante dichas técnicas se ha demostrado un aumento en la activación de dicha región cuando los sujetos son expuestos a estímulos amenazantes [Sergerie et al., 2008], a rostros de miedo y enojo [Vuilleumier et al., 2001; McClure et al., 2004] o a imágenes con contenido sexual [Hamann et al., 2004] (Ver figura 3B). También se ha demostrado que la amígdala de los pacientes que padecen desórdenes ansiosos presenta un funcionamiento alterado [Damsa et al., 2009] que se puede observar, en el caso de pacientes con trastorno por estrés post-traumático [Koenigs et al., 2007], como un incremento de su actividad.

Todos los datos anteriores nos dejan ver la importancia de la amígdala en el procesamiento del miedo y la ansiedad y es por esta razón que la hemos escogido como la región de interés para este estudio.

## Anatomía de la amígdala

El término “amígdala” fue acuñado en 1819 por Burdach para describir “una masa de sustancia gris en forma de almendra, localizada en el lóbulo temporal del cerebro” (Figura 4A y B). Maynert en 1867 la describe como una extensión ventromedial del claustrum del lóbulo temporal, una capa de sustancia gris localizada entre la capsula interna y externa de la corteza cerebral [Swanson y Petrovich, 1998; McDonald, 2003].

A partir de estas observaciones, pasó alrededor de medio siglo de controversias acerca de cómo clasificar a la amígdala, pues para algunos esta estructura era considerada una parte del núcleo lenticular (término utilizado para agrupar el globo pálido y el caudado putamen, grupos celulares de los ganglios basales) más que de la corteza.

En 1923 Johnston introdujo la descripción de la estructura amigdalina que prevalece hasta nuestros días, basada en estudios comparativos entre distintos grupos de vertebrados. En su descripción él propuso que la amígdala está dividida en un grupo de núcleos primitivos asociados al sistema olfatorio (núcleo medial (MeA), central (CeA) y cortical, así como núcleos del tracto olfatorio lateral), mientras que otro grupo de núcleos eran más reciente -filogenéticamente hablando-, y pertenecían a la corteza (núcleo lateral y basal, BLA) [Swanson y Petrovich, 1998; McDonald, 2003] (Ver figura 5A).

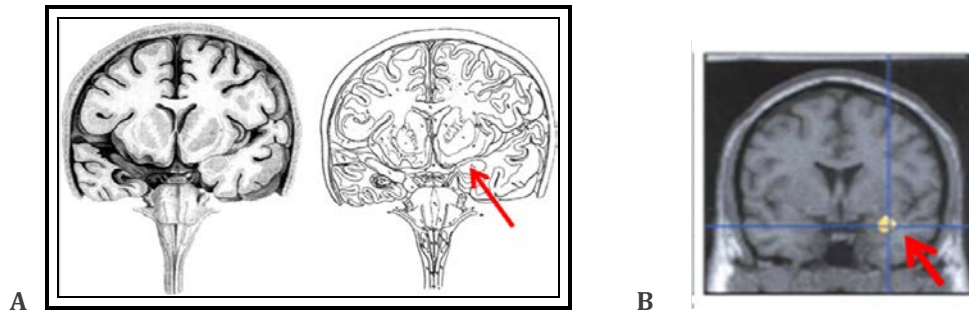
En los últimos 50 años, los estudios filogenéticos han permitido determinar más a detalle las afinidades y preferencias de cada grupo neural y el tipo de neurotransmisor que contiene cada uno de ellos. Dichos estudios han permitido ver que la amígdala es una región heterogénea que consta de 3 porciones principales:

- a) Una porción del estriado ventromedial especializada, en la que están incluidos los núcleos CeA y MeA,
- b) Una porción de la corteza olfatoria caudal (núcleo del tracto olfatorio lateral, núcleos corticales y áreas amigdalinas piriformes y post piriformes) y
- c) Una extensión del claustrum medial (BLA y núcleos posteriores).

A finales de los años 80's Alheid y Heimer acuñaron el término “amígdala extendida” para denominar así a un conjunto de estructuras que provienen del complejo amigdalino y que se extienden medial y dorsalmente. Tales estructuras incluyen la parte caudal del núcleo sublenticular, la sustancia innominata y el núcleo cama de la estría terminal. Cada una de ellas forma divisiones mediales y laterales que están asociadas con los núcleos central y medial de la amígdala, respectivamente [Mc Donald, 2003].

Aunadas a estas regiones, se agregan las descritas anatómicamente por Millhouse y estudiadas funcionalmente por Royer et al., (1999), denominadas **islas intercaladas paracapsulares** (IP). Dichas masas celulares se disponen alrededor del BLA y están constituidas por grupos de interneuronas GABAérgicas ricas en receptores dopaminérgicos D1, interconectadas entre sí y que probablemente representan interfases inhibitorias

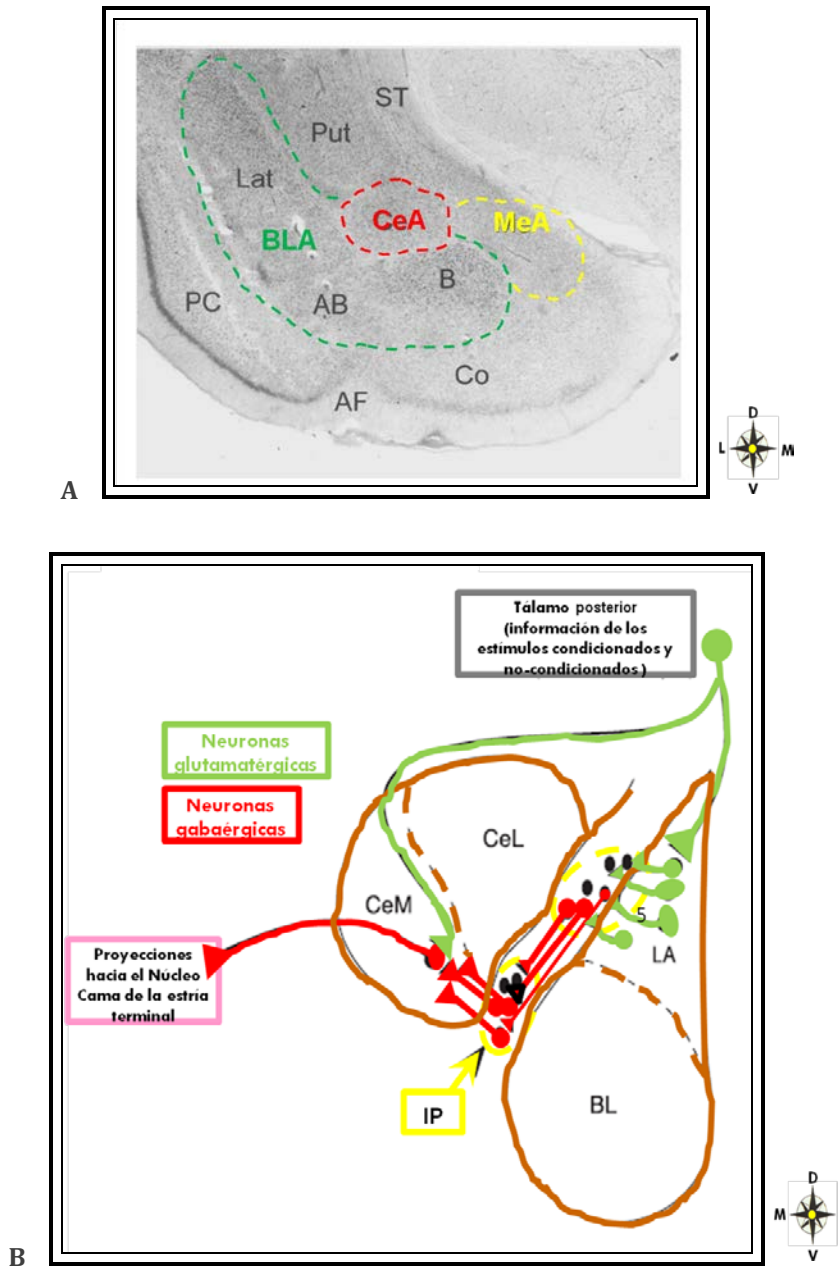
que controlan el flujo de impulsos nerviosos entre el BLA y el CeA, y entre la corteza prefrontal y el BLA (Pérez de la Mora et al., 2007). Estos núcleos reciben proyecciones de la corteza prefrontal medial (mPFC) y forman un sistema de inhibición tónica sobre el CeA, que, al ser “removida” produce la expresión del miedo y la ansiedad (Ver figura 5B). Esta “remoción” de la inhibición GABAérgica sobre el CeA es modulada por la dopamina, y se explicará con mayor detalle más adelante.



**Figura 4. Localización del complejo amigdalino**

**A** Primeras ilustraciones de Burdach del núcleo amigdalino en el humano; la flecha roja indica la localización de la estructura descrita por dicho autor y corresponde a lo que hoy se conoce como el núcleo basolateral [Tomado de Swanson y Petrovich, 2003].

**B** Imagen de la amígdala activada en estudios de fMRI en el humano al ser expuesto ante estímulos hostiles (rostros de enojo) [Tomado de McClure, et al. 2004]



**Figura 5. Distribución del complejo amigdalino**

**A** Tinción de Nissl de un corte coronal del complejo amigdalino del cerebro de la rata. En él se pueden observar los principales núcleos amigdalinos (CeA, MeA y BLA) y su ubicación con respecto a otras estructuras cerebrales: el núcleo Basal accesorio (AB), la fisura amigdaloides (AF), el núcleo cortical (CO), la corteza piriforme (PC), el caudado putamen (Put y la estría terminal (ST) [Tomado de McDonald, 2003].

**B** Las islas intercaladas paracapsulares (IP) como una interfase entre los núcleos BLA y CeA. Las IP son de naturaleza GABAérgica y se encuentran polarizadas de manera que los estímulos provenientes del núcleo lateral amigdalino (LA) -al que llegan distintos tipos de información sensorial-, hacen sinapsis con las IP localizadas en la porción más dorsal del espacio paracapsular (IPd). Estas IP envían aferencias a otro grupo de islas dispuestas en una posición más ventral (IPv), que proyectan al CeA y lo mantienen inhibido por su naturaleza GABAérgica. Cuando las neuronas del CeA son “deshinibidas”, tienen la capacidad de activar a otras estructuras cerebrales y producir respuestas ansiosas [Tomado de Paré et al., 2004].

## Procesamiento de la conducta del miedo y la ansiedad

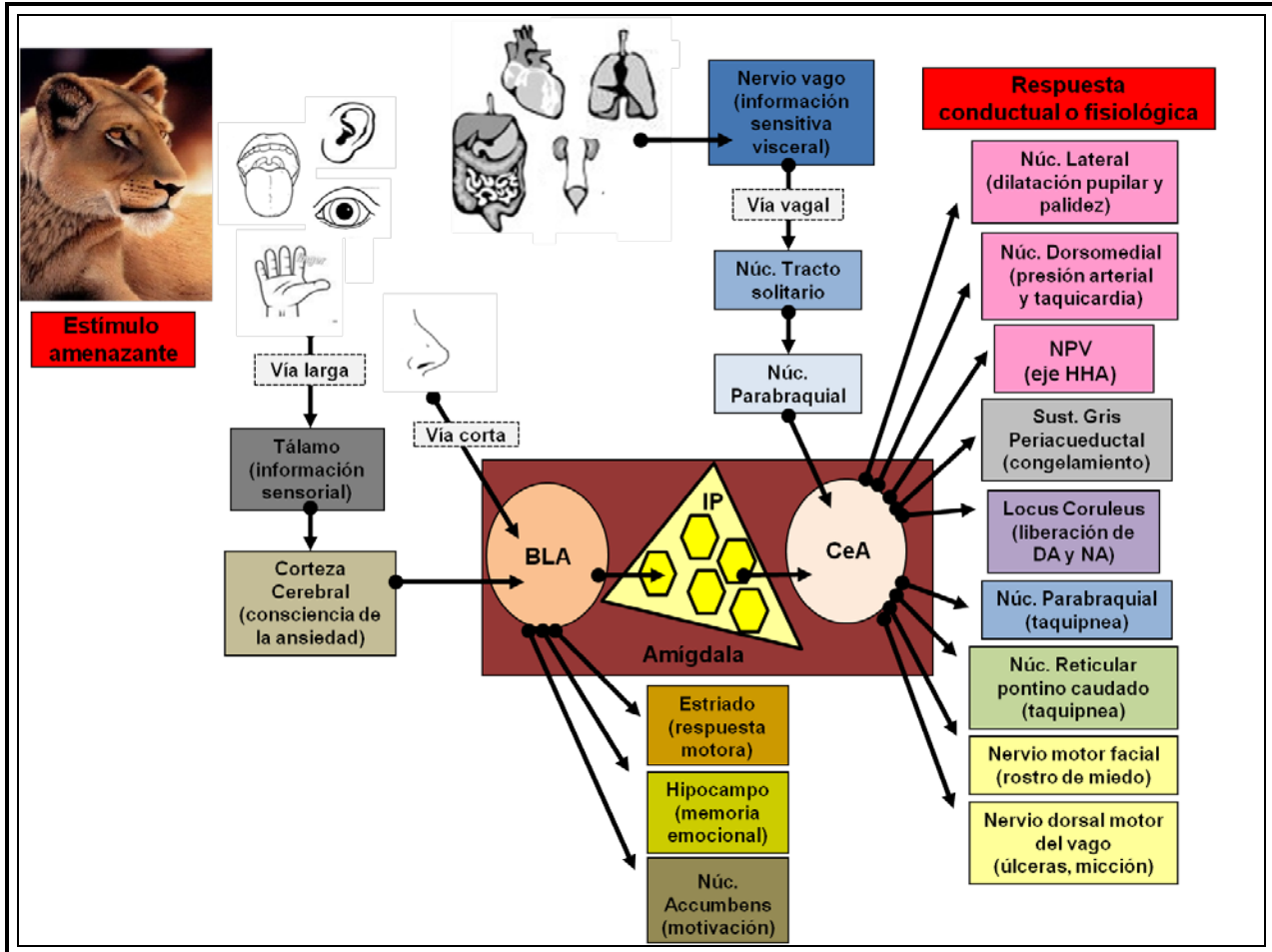
Las respuestas de miedo y ansiedad se producen mediante la activación concertada de una serie de estructuras cerebrales. Esta activación comienza con la percepción de un estímulo amenazante (la presencia de un depredador, por ejemplo). Nuestros órganos de los sentidos (excepto el olfato, que tiene una vía directa hacia la amígdala) envían esta información a través de las vías primarias sensoriales hacia los núcleos sensoriales del tálamo (núcleo geniculado lateral, núcleo paratenial, núcleo romboide, entre otros). El tálamo cuando recibe información que es relevante para la supervivencia del organismo envía esta información a la amígdala a través de dos vías [LeDoux, 1998]:

- 1) **Vía corta**, en la que el tálamo envía la información directamente a la amígdala, la cual monta una respuesta rápida y poco precisa, que le hace saber al individuo que está en una situación de peligro.
- 2) **Vía larga** es aquella en la que el tálamo manda esta información a la corteza sensorial para hacer un procesamiento detallado de la información y la representación del estímulo es más compleja. Una vez que pasa por la corteza, el mensaje es enviado hacia la amígdala para producir la respuesta.

Cuando la información ha sido enviada por estas vías hacia la amígdala, el núcleo BLA contrasta la información que llega por la vía rápida y la corta y transmite el mensaje a otras regiones del cerebro, siempre y cuando el estímulo que el organismo percibe atenta contra su supervivencia. Entre las regiones a las que proyecta el BLA se encuentran: a) el **hipocampo**, que interviene en procesos de consolidación de la memoria emocional y en el aprendizaje espacial [Biendenkapp y Rudy, 2008]; b) el **estriado**, que participa en la respuesta motora del animal ante el estímulo amenazante, promoviendo conductas de aproximación o evitación [Davidson e Irwin, 1999], c) el **núcleo accumbens**, que influye en el estado de motivación del organismo [Pérez de la Mora, 2003] y d) el **núcleo central amigdalino**, que a su vez se conecta con una serie de estructuras nerviosas (núcleos dorsomedial, lateral y paraventricular del hipotálamo, núcleo parabraquial, núcleo coeruleus, entre otros) para producir la respuesta fisiológica y conductual característica del miedo y la ansiedad. Para una mejor comprensión del proceso descrito anteriormente, se recomienda ver la Figura 4. La manera en que el BLA y el CeA se comunican aún tiene muchos misterios que develar. Sin embargo, se ha propuesto que la interfase inhibitoria que generan las IP's es fundamental en esta comunicación [Paré et al., 2004; Pérez de la Mora et al., 2007].

Se ha descrito que también la porción lateral del núcleo central amigdalino está innervada por neuronas GABAérgicas espinosas que constituyen otra interfase inhibitoria entre el CeA y las estructuras extra-amigdalinas con las que éste se comunica. Estas neuronas espinosas tienen la función de controlar el flujo de información hacia la porción medial del CeA y el núcleo cama de la estría terminal, para mantener una inhibición tónica sobre los núcleos autónomos e hipotalámicos hacia los que éstos proyectan. La inhibición de esta interfase GABAérgica, da entonces, como resultado la expresión del miedo y la ansiedad que se ha

descrito con anterioridad y está mediada por las IP's [Pérez de la Mora et al., 2008]. La forma en que se procesan las respuestas de miedo y ansiedad se encuentra representada esquemáticamente en la Figura 6.



**Figura 6. Procesamiento de la respuesta de miedo y ansiedad**

Ante una situación de peligro, el Sistema Nervioso Simpático (SNS) responde liberando abruptamente al torrente sanguíneo adrenalina, una hormona que agudiza los sentidos para permitir una mejor recepción de información del ambiente. Sus efectos son casi inmediatos en los organismos y se manifiestan produciendo taquicardia, taquipnea, aumento de flujo sanguíneo a los músculos para realizar acciones vigorosas, dilata las pupilas, entre otras reacciones. Estos cambios que ocurren en las vísceras son sentidos por el nervio vago, el cual envía la información visceral al núcleo del tracto solitario (vía vagal), el cual hace llegar la información al núcleo parabraquial y éste directamente CeA, donde se coordina la respuesta endócrina, autónoma y conductual característica del miedo y la ansiedad. Por otro lado, la información que percibimos a través de los órganos de es enviada al tálamo quien, a su vez, puede enviarla a la amígdala directamente (vía corta proveniente del sentido olfativo) o a la corteza cerebral para después mandarla a la BLA (vía larga-proveniente del oído, tacto y la vista). Los impulsos nerviosos sensoriales llegan al núcleo BLA de la amígdala, y ahí la información es evaluada y se transmite al núcleo CeA a través de las islas paracapsulares mediales. El BLA también envía la información a otras regiones cerebrales, como el hipocampo y la corteza cerebral, para la formación de la memoria, al estriado para montar la respuesta motora y al núcleo accumbens para modular el estado de motivación del organismo, procesos también relacionados con la respuesta ansiosa. Abreviaturas: BLA- núcleo basolateral de la amígdala, CeA- núcleo central de la amígdala, NPV- núcleo paraventricular del hipotálamo, IP-islas intercaladas paracapsulares. [Tomado y modificado de Pérez de la Mora, 2003 y Gallegos-Cari, 2010].



## Mecanismos de neurotransmisión dentro de la amígdala

Dentro de la amígdala, la actividad de diversos sistemas de neurotransmisión (GABA, dopamina, glutamato, entre otros) participa en la modulación de las respuestas ansiosas en los organismos. Los sistemas GABAérgicos y glutamatérgicos son responsables de los impulsos inhibitorios y excitatorios del Sistema Nervioso Central (SNC), respectivamente y su rol en el miedo y la ansiedad ha sido extensamente estudiado. Es posible que la ansiedad se module primariamente por la intermediación del sistema GABAérgico, que disminuiría globalmente la ansiedad y el sistema glutamatérgico, que tiene acciones ansiogénicas. Sin embargo, esta acción se encuentra modulada en forma compleja por otros sistemas de neurotransmisión que, al ejercer su acción, producen un aumento o disminución del estado ansioso. En la tabla 2 se muestran los principales neurotransmisores que participan en la producción y modulación de la ansiedad y su efecto sobre la ansiedad.

**Tabla 2. Neurotransmisores implicados en la ansiedad**

Neurotransmisor	Acción sobre la ansiedad
<b>GABA</b>	AL
<b>Ácido glutámico</b>	AG
<b>Colecistokinina</b>	AG
<b>Noradrenalina</b>	AG
<b>Serotonina</b>	AG
<b>Encefalina</b>	AL
<b>Dopamina</b>	AL, AG*
<b>Acetilcolina</b>	AL

[Tomada de Pérez de la Mora, 2003]

**Abreviaturas:** AG-ansiogénica; AL-ansiolítica. \*Dependiendo del tipo de receptores al que se activa, ver más adelante

Debido a que el interés principal de este trabajo es el estudio del sistema dopaminérgico intramigdalino, la discusión posterior se centrará en este sistema.

## Generalidades del sistema de neurotransmisión dopaminérgico

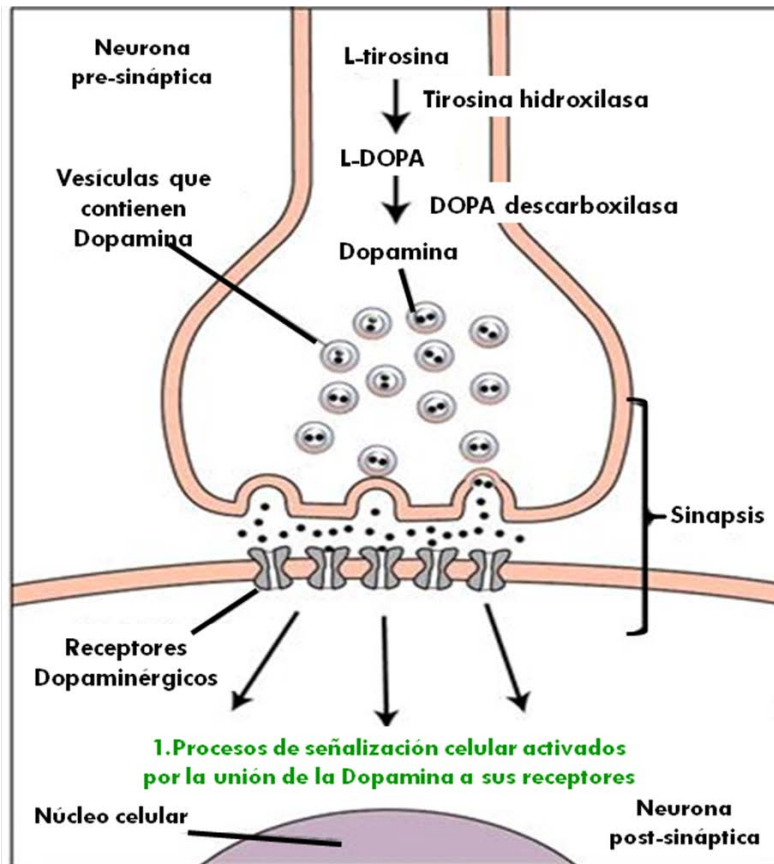
La dopamina (DA) es un neurotransmisor clásico que pertenece al grupo denominado catecolaminas. Dicho grupo incluye a la dopamina, noradrenalina y adrenalina que presentan en común la posesión de un grupo "catecol" y un grupo amino en su estructura química.

La DA es la catecolamina más abundante del cerebro y se produce cuando la fenilalanina obtenida en las proteínas consumidas en la dieta es transformada a L-tirosina por la enzima fenilalanina hidroxilasa. La L-tirosina es el aminoácido precursor de la síntesis de DA y por la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) es hidroxilada, formando así L-DOPA. Este compuesto sufre a su vez la eliminación de un grupo carboxilo por la acción de la DOPA descarboxilasa, para dar lugar a la dopamina. Cuando este neurotransmisor ha sido sintetizado es almacenado rápidamente en vesículas con la ayuda de una proteína transportadora llamada VMAT2, mediante un proceso dependiente de ATP. Una vez almacenada en las vesículas, la DA es enviada a la terminal nerviosa de donde será liberada mediante el proceso de exocitosis cuando se presenta un impulso nervioso (potencial de acción). Este proceso es modulado por un mecanismo de retroalimentación negativa, llevado a cabo por receptores presinápticos (o auto-receptores) los cuales producen una disminución de la liberación de este mensajero químico cuando sus niveles en el espacio sináptico son altos [Siegel et al., 2006].

La DA liberada al espacio sináptico puede tener 3 destinos distintos (ver figura 7):

- 1) Llegar a la membrana de la neurona post-sináptica para **activar a sus receptores** y desencadenar distintos procesos de señalización celular en ella.
- 2) Ser **recapturada** mediante su transportador membranal, denominado DAT, y así regresar al interior de la terminal nerviosa en la membrana pre-sináptica.
- 3) Ser **inactivada** mediante la acción de la MAO (monoamina-oxidasa) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y así formar sus metabolitos secundarios, el ácido dihidrofenilacético (DOPAC, formado por acción de la MAO) y el ácido homovanílico (producido mediante la transformación del DOPAC por la actividad de la COMT).

Los receptores dopaminérgicos son de tipo metabotrópico, es decir que en su estructura presentan siete dominios transmembranales y en su porción intracelular se encuentran acoplados a proteínas G. Las proteínas G son un complejo protéico compuesto por tres subunidades ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) que se disocian en dos partes cuando el receptor dopaminérgico es activado por su ligando: la unidad  $\alpha$  y el complejo  $\beta\gamma$ . La unidad  $\alpha$  puede ser de dos tipos: estimuladora ( $\alpha_s$ ) o inhibidora ( $\alpha_i$ ) cuando activan o reprimen la actividad de la adenilato ciclasa, respectivamente. La adenilato ciclasa es una enzima membranal responsable de la producción del AMPc, una molécula de señalización celular que ejerce sus efectos sobre otros blancos intracelulares, como por ejemplo, la proteína PKA, para así regular la función de muchas otras proteínas dentro de la célula [Kandel et al., 2001].



**Figura 7. Esquema del proceso de biosíntesis y liberación de la Dopamina.**

[Modificado de [www.arrakis.es](http://www.arrakis.es)]

Con base en criterios bioquímicos, farmacológicos y fisiológicos los receptores dopaminérgicos han sido clasificados en dos familias: la familia de los receptores tipo D1 si el receptor está acoplado a una subunidad de tipo  $\alpha_s$  y la familia de receptores tipo D2, si interactúa con subunidades de tipo  $\alpha_i$  [Kandel et al., 2001].

Estudios moleculares de clonación han permitido concluir que los receptores dopaminérgicos no provienen de entidades moleculares únicas, sino que tienen su origen en la acción de cinco genes distintos que codifican para cinco receptores diferentes. La familia de receptores tipo D1 está compuesta por los receptores D1 y D5, mientras que la familia de receptores tipo D2 está integrada por los receptores D2, D3 y D4. A pesar de que farmacológicamente los miembros de diferentes familias pueden ser discriminados fácilmente, es difícil diferenciar a los miembros de una misma familia [Siegel et al., 2006; Pérez de la Mora et al., 2010].

Las características de cada uno de los receptores que componen a estas familias, se pueden ver resumidas en la Tabla 3.

**Tabla 3. Características generales de los receptores dopaminérgicos**

Características	Familia de Receptores tipo D1		Familia de Receptores tipo D2		
	D1	D5	D2	D3	D4
<b>Aminoácidos</b>	446	477	415/444	400	387
<b>Agonistas</b>	SKF38393 SKF82958		Bromocriptina Quinpirole 7-OH-DPAT*	BP897	PD168077
<b>Antagonistas</b>	SCH23390		Haloperidol Raclopride Sulpiride	UH232	Clozapina L745870 U101387
<b>Efecto sobre vías de señalización</b>	Estimuladora: ↑ AMPc Dentro de la amígdala: La actividad de la AC es muy baja y, por tanto, la vía de señalización de los fosfoinosítidos es la importante ↑ PIP <sub>2</sub> : Movilización de Ca <sup>2+</sup> intracelular y activación de la PKC		Inhibitoria: ↓AMPc y canales Ca <sup>2+</sup> , ↑ Canales K <sup>+</sup>		
<b>Distribución en el SNC</b>	CP, Cx, TO, HP, NA	HT, HP, Cx	AVT, CP, CM, Cx, HP, NA	AVT, HT, HP, TO	Cer, CF, CM, Cx Med, NA,
<b>Distribución dentro de la amígdala</b>	IP +++ BLA ++	ND	CeAl. +++ IP ++	BLA +++ CeA ++ LA +	BLA y CeA (ARNm)

[Basada en Siegel et al., 2006; Alcántara-González, 2008; Pérez de la Mora et al., 2010]

**Abreviaturas:** AC: Adenilato Ciclasa; AVT: Area Ventral-tegmental; BLA: Núcleo Basolateral de la amígdala; CeA: Núcleo Central de la amígdala, Cer: Cerebelo; CF: corteza frontal, CM: cerebro medio; CP: caudado putamen; Cx: corteza cerebral; HT: Hipotálamo; HP: Hipocampo; IP: Islas intercaladas paracapsulares; LA: Núcleo lateral de la amígdala Med: médula espinal, NA: Núcleo Accumbens; ND: No determinado; TO: tubérculo olfatorio.

**Simbología:** +++: alta densidad de receptores; ++: densidad intermedia de receptores; +: baja densidad de receptores, ↑: aumento ↓: disminución

## **El sistema dopaminérgico en la amígdala y su papel en la modulación de la ansiedad**

Recientemente se ha reconocido al sistema dopaminérgico como un modulador importante de las respuestas de miedo y ansiedad, al secretarse e interactuar con otros sistemas de neurotransmisión dentro de los distintos núcleos que componen a la amígdala. En la siguiente sección se hablará con mayor detalle acerca del sistema dopaminérgico intra-amigdalino y las características que éste presenta. (Para una mayor profundidad en el conocimiento de este tema, se sugiere la lectura de la revisión escrita por Pérez de la Mora, y col. (2010)).

### **Distribución de los receptores D1 y D2 en la amígdala**

Los receptores dopaminérgicos D1 y D2 han sido detectados dentro de los núcleos amigdalinos y se ha observado que presentan una distribución topográfica diferencial. La expresión de los receptores D1 es rica en la isla intercalada principal y en las islas intercaladas paracapsulares, mientras que el núcleo basolateral presenta una densidad menor que en las islas y es casi nula en el resto de los núcleos amigdalinos (central, basomedial y cortical). Por su parte, los receptores D2 se encuentran principalmente expresados en el núcleo central, donde presentan un gradiente latero-medial, siendo la porción medial la que presenta menor densidad. Esta distribución diferencial de los receptores dopaminérgicos dentro de la amígdala, puede modular cada núcleo de una manera distinta. Los receptores D1 modulan las aferencias que influyen la actividad del núcleo basolateral y de las islas paracapsulares, mientras que los receptores D2 modulan las interneuronas GABAérgicas que influyen sobre la actividad del núcleo central (en su región lateral) y, por lo tanto, en las eferencias neuronales que se proyectan de esta región [Pérez de la Mora et al., 2010]. La distribución de los receptores dopaminérgicos intra-amigdalinos se encuentra resumida en la Tabla 3.

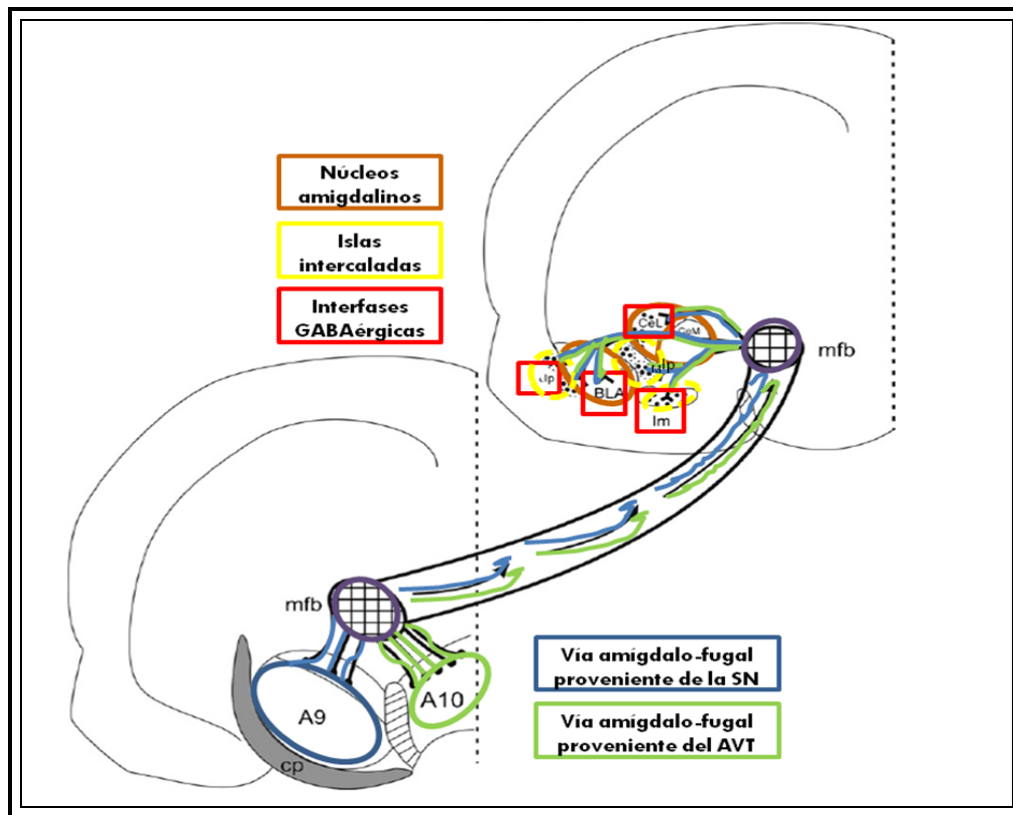
### **Vías dopaminérgicas que inervan a la amígdala**

En la década de los 60's Dahlström y Fuxe (1964) mostraron por primera vez que existían dos poblaciones distintas de neuronas en el mesencéfalo ventral. Estas células dopaminérgicas fueron clasificadas como los grupos A9 y A10 dependiendo de su localización: el grupo A9 correspondía a las células ubicadas en la sustancia nigra (pars compacta) y el A10 al área ventral tegmental (AVT) [Dahlström y Fuxe, 1964]. A través del tiempo, estos trabajos pioneros han sido extensamente confirmados por otros grupos de científicos alrededor del mundo. Actualmente, se sabe que las vías dopaminérgicas que inervan a la amígdala se originan de células situadas dentro de los grupos mediales, anteriores, laterales y posterolaterales del AVT y de la porción medial y lateral de la sustancia nigra [Pérez de la Mora et al., 2010]. En el cerebro de la rata, la mayoría de los axones dopaminérgicos que inervan a la amígdala se unen en el haz del cerebro medio y entran a la amígdala a través de la vía amigdalofugal. Un grupo menos prominente de axones entran a la amígdala al nivel del hipotálamo medial y caudal, a través de la decusación supraóptica, como componentes de la estría terminal (Ver Figura 8) [Pérez de la Mora et al., 2010].

Los estudios de la distribución de las terminales nerviosas dopaminérgicas, han mostrado que dentro de la amígdala éstas no tienen una distribución uniforme en los distintos núcleos que la componen, sugiriendo que existe una modulación dopaminérgica diferencial en los subnúcleos amigdalinos [Fuxe et al., 2003; Pinard et al., 2008]. Los plexos dopaminérgicos más densos están ubicados en la porción rostralateral de la isla intercalada principal, en las islas paracapsulares (medial y lateral) y en el núcleo central de la amígdala [Fuxe, 1965], mientras que en los núcleos basolateral y basomedial encontramos una inervación dopaminérgica menos densa y en los núcleos mediales y laterales es muy escasa [Pinard et al., 2008]. También se ha observado que en la porción rostralateral de la isla principal intercalada es mayor la concentración de inervaciones dopaminérgicas en comparación con la porción rostromedial y que en las islas intercaladas paracapsulares también existe un gradiente que va de mayor a menor concentración en el eje rostro-caudal [Fuxe et al., 2003].

Es importante mencionar que las terminales dopaminérgicas hacen sinapsis con interneuronas GABAérgicas dentro de la amígdala basolateral, en la porción lateral del CeA y en las IP's, que forman interfases inhibitorias que controlan el paso de impulsos a la porción medial del CeA, que representa la porción efectora principal de la amígdala. De esta manera, las terminales dopaminérgicas que llegan a la amígdala, están situadas estratégicamente en el sitio de respuesta GABAérgico que repercute en las aferencias intra y extra amigdalinas [Pinard et al., 2008; Pérez de la Mora et al., 2008].

Por lo tanto, al ser los núcleos basolateral y central las principales vías de aferencias y eferencias de la amígdala, respectivamente, y al ser sitios de recepción de impulsos eléctricos que están controlados por la acción GABAérgica, la vía mesoamigdalina dopaminérgica modula el miedo y la ansiedad inervando preferentemente dichas interfases inhibitorias.



**Figura 8. Inervación dopaminérgica en la amígdala de la rata**

Las fibras dopaminérgicas amigdalinas provienen de la región A9 (sustancia nigra, SN) y de la región A10 (área ventral tegmental, AVT), entran al haz del cerebro medio (mfb, por sus siglas en inglés) y se distribuyen dentro de la amígdala, inervando preferencialmente la porción rostrolateral de la isla principal (Im), las islas intercaladas lateral paracapsulares y la porción lateral del núcleo central (CeL) de la amígdala. Una cantidad menos prominente de axones inervan también al núcleo basolateral (BLA). A9 y A10 se refieren a las denominaciones originales acuñadas por Dahlström y Fuxe (1964) al grupo de células dopaminérgicas provenientes de la sustancia nigra y del área ventral tegmental, respectivamente [Tomada de Pérez de la Mora, et al., 2010].

## Relación Amígdala, Dopamina y Ansiedad

Se sabe que la amígdala se encuentra bajo una poderosa fuerza inhibitoria proveniente de la corteza prefrontal medial (CPFm) que proyecta a las islas intercaladas y al núcleo basolateral y produce sus efectos moduladores a través del reclutamiento de las interneuronas GABAérgicas de las que se habló anteriormente y a través de mecanismos de retroalimentación negativa mediados por GABA, que representan el 70% de la inhibición total que la CPFm produce sobre el núcleo basolateral [Marowsky et al., 2005]. En condiciones de estrés, la dopamina se libera dentro de la amígdala [Yokoyama et al., 2005] y modula la inhibición proveniente de la corteza suprimiendo el “freno GABAérgico” y permitiendo así la expresión de la ansiedad [Marowsky et al., 2005].

A través de la administración intra-amigdalina de agonistas y antagonistas dopaminérgicos se ha podido observar el efecto de estos fármacos en la conducta de los animales sometidos a paradigmas de miedo y ansiedad condicionados y no condicionados.

La tabla 4 resume los estudios publicados en torno al efecto de la administración de agonistas y antagonistas dopaminérgicos dentro de la amígdala en paradigmas de miedo condicionado y no condicionado. En estos trabajos es posible notar que la administración de agonistas para los receptores D1 intra-amigdalinos producen un efecto ansiogénico [Guarraci et al. 1999; Pérez de la Mora et al. 2008], mientras que la administración de antagonistas D1 producen un efecto ansiolítico [Lamont y Kokkinidis, 1998; Guarraci et al., 1999; Nader y Le Doux, 1999; Pérez de la Mora et al., 2005]. Estos datos permiten sugerir que los receptores D1 presentes en los núcleos amigdalinos donde éstos se expresan contribuyen a la adquisición de la expresión del miedo y la ansiedad. Por su parte, la administración de agonistas y antagonistas para los receptores de la familia D2 ha mostrado resultados controversiales, mostrando un efecto ansiogénico en modelos de miedo condicionado [Borowski y Kokkinidis, 1996; Mounro y Kokkinidis, 1997; Nader y Le Doux, 1999; Guarraci et al., 2000; Greba et al., 2001], y ansiolítico en modelos de miedo no condicionado [Pérez de la Mora et al., 2008]. Por lo anterior, se ha sugerido que el efecto que éste produzca depende del paradigma conductual utilizado en el estudio y la naturaleza del estímulo amenazante [Pérez de la Mora et al., 2010].

Aunque el mecanismo mediante el cual la dopamina atenúa la inhibición de la corteza aún no está totalmente entendido, existen evidencias de que los receptores D1 de las islas paracapsulares participan en forma importante en esta “desinhibición” [Marowsky et al., 2005]. La dopamina, a través de su acción sobre los receptores D1 hiperpolarizan las neuronas GABAérgicas dentro de las islas paracapsulares a través de la activación de canales rectificadores de potasio acoplados a proteínas G, proceso aunado a la posible interacción antagónica de los receptores D1-NMDA [Lee et al., 2002] que estarían produciendo una inhibición de los receptores glutamatérgicos y una desinhibición de los núcleos amigdalinos basolateral y central [Marowsky et al., 2005].



Un mecanismo alternativo que se ha propuesto es que los receptores D1 actúan sobre diferentes grupos de islas paracapsulares a través de un vía indirecta dependiente de PKA que facilita las interacciones D1-NMDA para incrementar su actividad [Radnikow y Misgeld, 1998]. A pesar de que los receptores D1 parecen jugar un rol principal en la modulación de las islas intercaladas paracapsulares, se ha reportado que la dopamina incrementa su excitabilidad mediante proyecciones del BLA e interneuronas a través de un mecanismo dependiente de los receptores D2 [Kröner et al., 2005]. Sin embargo, como la densidad de los receptores D2 en el núcleo lateral y basolateral es muy baja, es posible que los efectos sean mediados por los receptores D2 localizados en las neuronas de proyección del BLA. Por otro lado, se ha propuesto que, dado que la mayoría de los experimentos que han estudiado estos receptores a través de inyecciones sistémicas de fármacos agonistas o antagonistas de los receptores D2 [Rosenkranz y Grace 2002], es posible que la activación de estos receptores ocurra en otros sitios y que los efectos observados sean de tipo indirecto [Pérez de la Mora et al., 2010].

**Tabla 4. Efectos de la administración intra-amigdalina de agonistas y antagonistas dopaminérgicos en paradigmas de miedo condicionado y no condicionado**

Fármaco	Sitio de la inyección	Dosis (µg/lado)	Observaciones conductuales	Efecto	Referencia
<b>Agonistas D1</b>					
SKF82958	CeA	1.0-4.0	↑ el congelamiento en la prueba de CC	Ansiogénico	Guarraci, 1999
SKF38393	BLA	0.33	↑ tiempo de enterramiento en la prueba de ED	Ansiogénico	Pérez de la Mora , 2008
<b>Antagonistas D1</b>					
SCH23390	BLA + CeA	3	X la respuesta de sobresalto en la prueba de SPM	Ansiolítico	Lamont y Kokkinidis,1998
SCH23390	CeA	0.5-2	X la conducta de congelamiento en la prueba de CC	Ansiolítico	Guarraci, 1999
SCH23390	BLA	0.4-4.0	X el condicionamiento en la prueba de CSO	Ansiolítico	Nader y LeDoux,1999
SCH23390	BLA+IP	0.03-0.12	↑ el tiempo de latencia para entrar al espacio iluminado y el tiempo de permanencia en éste en la prueba de CLO	Ansiolítico	Pérez de la Mora, 2005
<b>Agonistas D2</b>					
Quinpirole	VTA	1.4	X el condicionamiento en la prueba de CSO	Ansiolítico	Nader y LeDoux, 1999
Quinpirole	VTA	1.0	X la respuesta de sobresalto en la prueba de SPM	Ansiolítico	Borowski y Kokkinidis,1996 Mounro y Kokkinidis, 1997
<b>Antagonistas D2</b>					
Raclopride	BLA	2.0-8	X la respuesta de sobresalto en la prueba de SPM	Ansiolítico	Greba, 2001
Raclopride	CeA	0.73,2.4	↑ tiempo de enterramiento en la prueba de ED	Ansiogénico	Pérez de la Mora, 2008
Eticlopride	CeA	1.0	↓ la conducta de congelamiento en la prueba de CC	Ansiolítico	Guaraci, 2000

[Tomada de Pérez de la Mora et al., 2010]

**Abreviaturas:** CC: Congelamiento Condicionado; CLO: Caja Luz-Obscuridad; CSO: Condicionamiento de segundo orden; ED: Enterramiento defensivo; SPM: Sobre salto potenciado por el miedo. **Simbología:** ↑: aumento; ↓: disminución; X: bloqueo

## **La relación diabetes y ansiedad**

### **Aspectos históricos**

La tesis de que el estrés puede contribuir a la etiología de la diabetes fue sugerida por primera vez en 1689 por Thomas Willis, quien notó que síntomas que se han interpretado actualmente como “estrés” precedían a la aparición de síntomas de lo que hoy se conoce como “diabetes” en algunos de sus pacientes. En el siglo XIX, el rol del estrés en la etiología de la DM fue algo firmemente establecido en la literatura médica. Henry Maudsley observó que la DM a menudo ocurría como resultado de un trauma repentino, mientras que William Osler sugirió que una manera de tratar a los pacientes diabéticos con “estrés mental severo” era el reposo y la administración de opioides. En el siglo XX Cannon fue el primero en demostrar experimentalmente la relación DM-ansiedad al describir cómo el estrés inducía hiperglucemia en gatos “normales” a los que sometió a un proceso quirúrgico. Estos animales eran confinados en un soporte donde se inmovilizaban por distintos periodos de tiempo. Los animales eran intervenidos y se les colocaba un tubo en el estómago, a través del cual se les daba una gran cantidad de agua, para coleccionar la orina de ellos rápidamente. Al realizar este procedimiento, Cannon observó que había una relación entre el estado emocional del animal y el establecimiento de la hiperglucemia. Los animales que reaccionaban con mayor agresividad o con más miedo durante el tratamiento, eran los que desarrollaban glicosuria (presencia de glucosa en la orina) más rápidamente, en comparación con los que respondían al procedimiento más calmadamente. A principios de la década de los 80’s Caponni observa evidencia de que animales parcialmente pancreatomizados desarrollaban temporal o permanentemente diabetes después de ser sometidos a estrés por inmovilización [ver en Surwit, et al. 1993].

### **Actualización de la literatura**

A finales del siglo XX el interés por estudiar la relación DM-ansiedad se incrementó al comenzar a aparecer reportes que indicaban que los cuadros de ansiedad en el humano son más frecuentes en la población diabética que en la general [Lustman et al., 1998; Anderson et al., 2002; Grisby et al., 2002; Kruse et al., 2003; Clavijo et al., 2006]. En el 2008 Lin y col., calcularon la prevalencia de ansiedad y depresión en 42,697 pacientes diabéticos provenientes de países de distintas regiones (Europa, Asia, Medio Oriente, América, etc.), demostrando que estos trastornos afectivos son más frecuentes en los individuos diabéticos que en los sanos en todas las regiones estudiadas. Recientemente, los estudios epidemiológicos en torno a esta relación han proliferado considerablemente y se han enfocado también en la prevalencia de este tipo de afecciones emocionales en niños y adolescentes diabéticos, arrojando evidencias de que los trastornos de tipo ansioso (trastorno por ansiedad generalizada, estrés post-traumático, agorafobia y fobia social) son más comunes en la población diabética que en la general [Northam et al., 2005; Herzer y Hood, 2010].

La prevalencia de los trastornos de ansiedad en personas que padecen DM va desde el 6.3%, al 15.6%, aunque valores extremos (73.8%) han sido reportados en una población de pacientes con DM2 en Brasil [Clavijo, et al. 2006]. Esta variabilidad de datos se puede ver reflejada también en resultados contrastantes reportados en la literatura, como por ejemplo, los trabajos de Lloyd et al. (2000 y 2003) y Shaban et al. (2006) que muestran que la prevalencia de ansiedad en los diabéticos es mayor en las mujeres que en los hombres y que esta es mayor en los pacientes con DM1 que en los que padecen DM2 [Coker, et al. 2000]. Estos datos se contraponen a lo reportado por Grisby y col. (2002), que establece que la prevalencia de ansiedad es mayor en hombres que en mujeres y que es similar en los pacientes con DM1 y DM2. Controversias adicionales han sido observadas en el trabajo de Kruse et al. (2003), en donde se reporta que existe una relación inversamente proporcional entre los valores de HbA(1c) (hemoglobina glucosilada, un índice de control glucémico) y los síntomas clínicos de ansiedad, mientras que otros autores han reportado que existe una correlación positiva entre los niveles de HbA(1)c y los valores de ansiedad medidos en las escalas clínicas para diagnóstico de este trastorno, como la de de Hamilton y Hopkins [Anderson, et al. 2002; Eren, et al., 2003; Moussa, et al. 2005, Shaban, et al. 2006]. Una correlación entre la hiperglucemia y las manifestaciones de ansiedad como los episodios de pánico en pacientes con DM1 y DM2 ha sido también reportada por otros autores como Sommerfield y col. (2004) y Ludman y col. (2006). Cabe mencionar que a pesar de que en México la diabetes hoy representa el principal problema de salud pública del país, no existe aún ningún reporte concerniente a la prevalencia de trastornos de ansiedad en la población diabética, cuestión que sería importante estudiar en nuestro país.

Las razones de las discrepancias en los estudios clínicos de los cuales se habló con anterioridad no son claras, pero se deben posiblemente a las distintas metodologías empleadas, al tipo de población estudiada, la naturaleza de las escalas utilizadas para medir los trastornos de ansiedad, así como las variables inherentes a los estudios de tipo clínico, como son las características particulares de cada paciente (duración de la enfermedad, presencia o ausencia de complicaciones tardías, adherencia al tratamiento, entre otras) [Surwit, et al. 1993; Bowman et al., 2010].

Debido a la marcada variabilidad observada en humanos la relación DM-ansiedad ha sido también estudiada utilizando modelos animales que permiten un mejor control de las variables experimentales. A pesar de ello, los resultados obtenidos han sido también contrastantes.

Así, mientras que los primeros trabajos publicados que estudiaron la relación DM-ansiedad en roedores utilizando la administración de STZ en ratones y ratas que modelan a la DM1 no encontraron efectos significativos sobre la ansiedad utilizando el EPM [Chauloff et al., 1994; Hilakivi et al., 1990], publicaciones más recientes han reportado efectos ansiogénicos en esta prueba [Thorré et al., 1997; Ramanathan et al., 1998], así como en el laberinto elevado en forma de cero [Ramanathan et al., 1998], el campo abierto con agujeros (hole-board) [Kamei et al., 2001], el OFT [Ramanathan et al., 1998] y la interacción social [Ramanathan et al., 1998].

También ha sido observado que roedores pertenecientes a modelos que simulan a la DM2, tales como las ratas transgénicas intolerantes a la glucosa “OLETF”, los ratones resistentes a la insulina “*ob/ob*” y los ratones hiperglucémicos no obesos “*Ins<sup>2</sup>Akita*” -entre otros modelos-, muestran conductas tipo ansiosas en distintas pruebas conductuales, tales como: el EPM [Harris et al., 2001; Li et al., 2002; Akakawa et al., 2007], la caja luz-obscuridad [Yamamoto et al., 2000; Harris et al., 2001], el OFT [Watanabe et al., 2007; Nishimura et al., 2009], la neofobia alimentaria [Li et al., 2002], entre otras. Para una revisión más detallada de los trabajos publicados en las últimas décadas en torno al estudio de la relación diabetes-ansiedad, se recomienda ver las tablas contenidas en el anexo 4 de este trabajo.

Es interesante que en el estudio de Ramanathan et al., 1998 y Kamei et al., 2001, los roedores hechos diabéticos por la administración de STZ, al ser tratados con diazepam (fármaco ansiolítico) o con fluoxetina, fluvoxamina y desipramina, que tienen también actividad ansiolítica, requieren de una mayor dosis de dichos fármacos para observar efectos ansiolíticos, por lo que se ha sugerido que algunos de los mecanismos de neurotransmisión involucrados en el funcionamiento de estos compuestos pudieran estar alterados en los roedores hiperglucémicos.

Aunque los mecanismos involucrados en estas alteraciones que se presentan en los sujetos diabéticos no se conocen con claridad, se han ofrecido algunas explicaciones en la última década, las cuales se pueden ver resumidas más adelante.

### **Relación síndrome metabólico y ansiedad**

El interés por estudiar cómo el síndrome metabólico (SM) ha sido asociado a trastornos psiquiátricos, como la depresión y la ansiedad ha crecido en los últimos años. Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios clínicos han sido contradictorios. En el 2009, Carroll y sus colaboradores mostraron evidencia de una asociación positiva entre el trastorno por ansiedad generalizada y el SM dentro de una población de veteranos de la Guerra de Vietnam en los Estados Unidos, pero Hildrum et al., en ese mismo año no encontraron esa asociación en la población noruega que ellos estudiaron. Dos años después, en el 2011 Linville y col. reportaron que la prevalencia de SM era igual en una población de prisioneros de la Guerra de Vietnam repatriados con y sin trastorno por estrés post-traumático, al ser comparados con una población control estadounidense. Ese año también Weiss et al., publicaron que el trastorno por estrés post-traumático estaba relacionado con un incremento en las tasas de SM en una población urbana afro-americana. Más recientemente, Albert y su grupo de trabajo (2013) hicieron un estudio transversal en el que observaron que la prevalencia de SM en una muestra de pacientes con trastorno obsesivo-compulsivo es mayor que en la población general de Italia. Al igual que en el caso de la diabetes, hasta ahora en México no existe ningún reporte científico donde se haya estudiado la prevalencia de trastornos de ansiedad en pacientes que han sido diagnosticados con síndrome metabólico, lo cual será de gran relevancia para poder hacer un mejor manejo clínico de los aspectos psiquiátricos en esta población específica.

Debido a que los estudios clínicos mencionados con anterioridad están llenos de contrastes, los estudios que utilizan modelos animales de SM y ansiedad ha sido de gran utilidad para tratar de esclarecer dicha relación. Cabe mencionar que la mayoría de estos modelos animales simulan al SM de manera parcial solamente y/o traslapan sus características con las de la DM2, haciendo difícil la diferenciación de estas entidades patológicas.

La mayoría de los estudios realizados para estudiar esta asociación se ha realizado en roedores genéticamente modificados, pero también han arrojado resultados conflictivos, pues se han reportado un perfil ansiogénico en ratas tipo OLETF [Yamamoto et al., 2000; Li et al., 2002] y ratones *ob/ob* [Finger et al., 2010], ausencia de efectos en el perfil ansioso de las ratas obesas tipo Zucker [Chauloff et al., 1994] y un perfil ansiolítico en ratones *db/db* [Sharma et al., 2010]. Por esta razón, estudios que utilicen otras aproximaciones experimentales para producir una condición similar al SM del humano es necesaria. A este respecto, ha sido reportado que el cambio en la dieta de los animales aumentando la cantidad de grasas o azúcares puede producir síntomas similares al SM y la diabetes mellitus tipo 2 en los animales experimentales (ver la revisión de Larqué et al., 2011 para mayor detalle). En los últimos años dos distintos grupos: el de Marks et al., (2009) y el de Sharma y Fulton (2013) demostraron que roedores que son sometidos a una dieta rica en grasas muestran un perfil ansiogénico en distintos paradigmas experimentales. Sin embargo, se desconoce qué tipo de conducta manifiestan animales que hayan sido sometidos a un régimen rico en carbohidratos, lo cual fue objeto de estudio en este trabajo en animales que ingieren una solución de sacarosa al 20%, manipulación que ha demostrado producir desde los 2 meses una condición similar a la del SM: obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión arterial y dislipidemia [Larqué et al., 2011]. Cuando el tratamiento se prolonga hasta los 6 meses, a estos signos se añade una condición hiperglucémica moderada en los animales experimentales [Velasco et al., 2012] (para conocer los detalles del modelo y las condiciones experimentales del estudio ver más adelante).

Los mecanismos que subyacen a la relación síndrome metabólico-ansiedad aún son desconocidos, pero sin lugar a dudas, serán el objeto de un buen número de estudios científicos en los siguientes años.

### **Mecanismos relacionados con el incremento de ansiedad en los individuos diabéticos**

Hasta hoy no existen explicaciones contundentes relacionadas con el incremento de ansiedad en los pacientes diabéticos. Sin embargo, en la última década se ha incrementado de forma importante el número de publicaciones en los que se pretende explorar algunos de los mecanismos relacionados con esta comorbilidad (diabetes-ansiedad, síndrome metabólico-ansiedad), los cuales se mencionan a continuación:

## **1) Alteraciones en el funcionamiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal**

A finales del siglo XX se demostró que los animales diabéticos presentaban hipertrofia de las glándulas adrenales, condición que estaba relacionada con la producción crónica de corticosterona (CORT) cuando eran expuestos a perturbaciones ambientales [Bellush et al., 1991; Bellush y Reid, 1994]. También existen evidencias de que los animales tratados con STZ muestran niveles plasmáticos más elevados de ACTH y CORT en comparación con los controles, efecto que puede ser revertido por la administración exógena de insulina y/o leptina [Chan et al., 2001 y 2002; Barber et al., 2003]. Aunado a esto, se ha demostrado que los roedores tratados con STZ presentan un incremento en los niveles de ARNm de CRH en las neuronas magnocelulares del PVN, mientras que disminuyen en las neuronas parvocelulares de este mismo núcleo. Además, el tratamiento con STZ induce la producción del ARNm del receptor CRH-R1 en el PVN y produce una disminución en la producción del receptor CRH-R2 en el núcleo ventromedial del hipotálamo [Huang et al., 2006]. En apoyo a esta idea, Lemus-Castellanos (2010) reportó que ratones de la cepa Swiss Webster inyectados con STZ (180mg/kg, i.p.) muestran niveles de CORT incrementados después de 10 y 20 días de la inducción de la diabetes en comparación con animales no tratados. Además, dichos animales después de haber sido sometidos a un agente estresor presentan niveles plasmáticos de CORT más altos que los controles y permanecen elevados 120 minutos posteriores a dicha manipulación. Lemus-Castellanos propone en su tesis que la hiperactivación del eje HHA puede estar originada por una alteración en el mecanismo de retroalimentación negativa de este eje, a causa de una disminución en el número de receptores a glucocorticoides (GR's), o por una desensibilización de los mismos. Esta hipótesis ha sido también sugerida por Chan y cols. (2002) que observaron una respuesta de supresión de secreción de CORT disminuida en ratas tratadas con STZ cuando se les administra dexametasona (un agonista de los GR's). En conjunto, estos datos muestran que en los animales "diabéticos" existe una sobre-activación del eje HHA, pero que esta alteración puede ser revertida cuando los niveles de glucosa regresan a su estado basal, restaurando la actividad neuroendócrina del individuo.

## **2) El papel de la insulina como sustancia neuromoduladora**

Durante muchos años la insulina era considerada únicamente una hormona que tenía efectos metabólicos periféricos, excluyendo al cerebro de sus blancos de acción. Sin embargo, trabajos de los años 60 y 70's en donde se reportó que la insulina y sus receptores se expresan en altas concentraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) de la rata, revolucionaron el concepto anterior y se abrieron nuevas líneas de investigación para conocer los efectos de la insulina en el cerebro. Actualmente se sabe que la insulina pasa del torrente sanguíneo al SNC a través de la barrera hematoencefálica mediante un sistema de transportador saturable y que su receptor se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro, puesto que se presenta en el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el hipocampo, el hipotálamo, el cerebelo, los plexos coroides, entre otras regiones.

Hoy día se sabe que la insulina es una hormona cuyos efectos en el cerebro son diversos, entre los cuales se encuentran los siguientes (basado en las revisiones de Banks et al., 2012, Kaidanovich-Beilin et al., 2012 y Ghasemi et al., 2013):

- **Controla el apetito y el peso corporal**, puesto que al infundirse i.c.v o dentro del hipotálamo produce efectos anoréxicos (disminución del apetito) y disminuye el peso corporal, mientras que se observan efectos orexigénicos (aumento del apetito) y se incrementa el peso cuando se reduce la señalización mediada por la insulina y sus receptores en condiciones de obesidad, resistencia a la insulina y/o DM2.
- **Altera las funciones cognitivas y de memoria.** Se ha visto que pacientes con DM1 exhiben una disminución en la capacidad para realizar pruebas cognitivas, tales como el aprendizaje verbal, el razonamiento abstracto y ciertas funciones psicomotoras. Las alteraciones cognitivas, como la reducción de la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje, también han sido observadas en modelos de DM en ratas (OLETF y ratas tratadas con STZ). En contraste, cuando a pacientes obesos y con enfermedad de Alzheimer que presentan deficiencias para realizar tareas de memoria verbal se les administra insulina por vía intranasal se producen mejoras significativas en estas funciones.
- **Actúa como sustancia neuromoduladora** al alterar actividad neuronal y la liberación de otros neurotransmisores. Estudios electrofisiológicos realizados por Kovacs y Hajnal (2009) en neuronas del cerebelo demostraron que disminuye la tasa de disparo aproximadamente en un 60% cuando se da un estímulo de insulina, efecto que se bloquea cuando se utilizan inhibidores de los receptores de la familia tirosina cinasas. También se ha observado que la insulina puede tener efectos inhibidores en la actividad de las neuronas piramidales hipocampales. Por otro lado, estudios in vitro han demostrado que la actividad de algunos receptores ionotrópicos, como GABA-A y el canal dependiente de Potasio K.v.1.3 puede ser afectada por el tratamiento con insulina en neuronas provenientes de la corteza prefrontal y del bulbo olfatorio, respectivamente. Asimismo, se ha reportado que la insulina puede alterar la función del sistema Glutamatérgico fosforilando las distintas subunidades del receptor NMDA en el hipocampo o incrementando los procesos de exocitosis de este receptor en la sinapsis, lo cual repercute directamente en procesos de memoria y aprendizaje, como se mencionó en el párrafo anterior. Además se ha reportado que la reducción de la producción de insulina produce un aumento en la expresión de receptores dopaminérgicos en animales tratados con STZ, mientras que la administración sistémica de esta hormona puede aumentar la concentración de metabolitos dopaminérgicos y serotoninérgicos en el líquido cerebro espinal y aumentar la tasa de recambio de la adrenalina y noradrenalina en el hipotálamo. Finalmente, la insulina puede tener un efecto estimulante en la recaptura de aminoácidos requeridos para la síntesis de neurotransmisores llevada a cabo por las neuronas, por lo que ésta es otra manera en la que la insulina puede alterar la función del CNS. Estos datos, en conjunto, sugieren que los cambios fisiológicos y patológicos en la concentración de insulina pueden estar directamente relacionados con el cambio de la actividad neuronal en distintas regiones del cerebro.

- **Tiene efectos neurotróficos y proliferativos.** Existen evidencias de que la insulina administrada sistémicamente puede provocar el aumento de la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa, la cual está considerada como un indicador de crecimiento neuronal. Asimismo, se ha reportado que la insulina es necesaria para que el NGF (factor de crecimiento neural) se una a su receptor y estimule la formación de neuritas, puesto que en ausencia de la hormona las neuronas en cultivo no responden a éste. Estudios in vitro han demostrado también que al utilizar sueros anti-insulina se abate la distribución correcta de los neurofilamentos, el crecimiento de las neuritas y la diferenciación neuronal. La insulina también estimula el almacenamiento de glucógeno en los astrocitos, los cuales son esenciales en el soporte trófico y metabólico de las neuronas. Por las razones anteriores, se ha propuesto que la insulina es una molécula que coordina el crecimiento y la diferenciación neuronal con el estado de nutrición de las neuronas.
- **Tiene efectos neuroprotectores,** dado que ejerce efectos protectores en las siguientes condiciones experimentales: en apoptosis inducida por privación de suero sobre las neuronas cerebelares, en apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en líneas celulares derivadas de la retina y en apoptosis inducida por la secreción de corticosterona en las neuronas hipocámpales. Se ha demostrado también que en animales tratados con STZ existe un aumento de apoptosis de neuronas corticales e hipocámpales; sin embargo, el tratamiento con insulina produce una reducción en la tasa de muerte neuronal de forma significativa. Además, la insulina previene la reducción de la expresión de la proteína Bcl-2, la activación de la vía de la caspasa-3 y la fragmentación del ADN, procesos involucrados en los mecanismos de muerte celular. Asimismo, se ha demostrado que esta hormona antagoniza los efectos deletéreos del estrés oxidativo al restaurar las funciones metabólicas de las neuronas. Además se ha propuesto que algunos procesos anti-apoptóticos son insulino-dependientes, como es el caso del valproato en contra de la apoptosis mediada por la reducción de K<sup>+</sup>, promoviendo así la supervivencia neuronal.

Aunque aún no se conoce con precisión cómo afecta la insulina las funciones del sistema límbico, los datos anteriores nos hacen sugerir que la amígdala es una región susceptible de ser afectada por la insulina y con ello, probablemente también pueda fungir como una hormona reguladora de las emociones. Para una mayor comprensión de este tema se recomienda leer las revisiones de Banks et al., 2012, Kaidanovich-Beilin et al., 2012 y Ghasemi et al., 2013.

### 3) El rol del estrés oxidativo

Es bien sabido que altos niveles de glucosa en el espacio intracelular producen daños neuronales al inducir la formación de productos terminales de glucosilación avanzada (AGE's por sus siglas en inglés), que están relacionados con un incremento del estrés oxidativo en el organismo. Esta condición se ha asociado a distintas alteraciones en el SNC y al desarrollo de complicaciones tardías de la DM, entre las que se incluyen las llamadas



neuropatía periféricas [Sugimoto, et al. 2008]. Asimismo, se ha reportado que una condición hiperglucémica persistente, puede causar una producción elevada de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) con capacidad de interactuar con los componentes celulares y contribuir así a la oxidación de las proteínas, a la producción de daño a la molécula del ADN y a la peroxidación de los lípidos que componen la membrana celular. Recientemente, Salim (2010) reportó que en un modelo de estrés oxidativo en ratas –inducido por la administración oral de xantina y la inyección de xantina oxidasa- provocó el incremento de las conductas ansiosas en paradigmas conductuales como la caja luz oscuridad y el campo abierto. Así, el incremento del estrés oxidativo en los animales diabéticos, así como la disminución de los mecanismos antioxidantes endógenos (la actividad de la glutatión peroxidasa y los niveles de Vitamina A, E y C) [Comin et al., 2010], podrían contribuir al incremento del estado ansioso en estos animales. En apoyo a lo anterior se ha demostrado que muchas de las complicaciones funcionales y morfológicas del paciente diabético se pueden prevenir con el uso de antioxidantes. Por ejemplo, estudios en pacientes diabéticos han mostrado una reducción en los síntomas neurológicos negativos y una disminución de los desórdenes ansioso-depresivos después de 14 días de tratamiento con agentes antioxidantes, como la oxipiridina y los derivados del ácido succínico (emoxipina, reamberina y mexidol) [Volchegorskii, et al. 2005] En este mismo sentido, se han reportado efectos neuroprotectores tras el tratamiento de ratas diabéticas con curcumina y sesamol, compuestos anti-oxidantes fenólicos [Kuhad et al., 2007 y 2008]. Cabe señalar que este tratamiento produjo una mejoría en el déficit cognitivo que los animales diabéticos muestran al ser evaluadas en el laberinto en agua de Morris, una prueba de aprendizaje para roedores. Dichos resultados sugieren un papel importante del estrés oxidativo en el establecimiento de alteraciones en el SNC del individuo diabético (incluyendo los trastornos ansioso-depresivos) y aportan una alternativa para protegerlos del daño causado por la hiperglucemia. Éste, aunque es un tema prometedor, es bastante reciente y, por lo tanto requiere de más estudios para ser corroborado.

#### **4) Alteraciones en distintos sistemas de neurotransmisión y/o sus receptores**

Hasta hace poco el cerebro no se reconocía como un blanco afectado por las complicaciones tardías de la DM. Sin embargo, en la actualidad se acepta que la hiperglucemia crónica influencia la sensibilidad de distintos sistemas de neurotransmisión a varios agentes farmacológicos en animales de laboratorio. En relación con esto, se ha reportado un incremento en la sensibilidad a barbitúricos y una disminución en la sensibilidad a la d-anfetamina, a las p-cloroanfetaminas y al tetracloruro de carbono en animales diabéticos [Kamei et al., 2002]. También se ha reportado que tanto ratas y ratones tratados con STZ son significativamente menos sensibles que sus controles no diabéticos al efecto nociceptivo de la morfina sugiriendo, junto con los datos anteriores, que distintos mecanismos de neurotransmisión se encuentran alterados en los sujetos diabéticos.

Aunque la información disponible es escasa, recientemente se han publicado trabajos que arrojan información sobre la participación de algunos sistemas de neurotransmisión en el incremento de ansiedad que muestran las ratas “diabéticas”. Algunos de los ejemplos que existen se mencionan a continuación:

- **Neuropéptidos hipotalámicos.** El AgRP (agouti-related peptide) y POMC (pro-opio-cortico-melanocortina) son neuropéptidos que están presentes en los núcleos arcuatos del hipotálamo y controlan aumentando o disminuyendo, respectivamente la ingesta de alimentos. La producción de estos neuropéptidos está sujeta, entre otros factores, a la acción de la leptina, una hormona secretada por el tejido adiposo. Cuando los niveles de leptina son altos, se incrementa la producción de POMC, mientras que cuando son bajos, se produce AgRP. Asakawa y col. (2003) estudiaron el efecto de la leptina en la conducta de ratones *ob/ob* (carentes del gen encargado de producir la leptina) y encontraron que estos ratones al ser sometidos al EPM mostraron un perfil ansiogénico, el cual fue revertido con la administración intraperitoneal de leptina, sugiriendo así que esta hormona contribuye no sólo a disminuir el peso corporal, sino a reducir los niveles de ansiedad en estos animales. Por otro lado, cuando la expresión de los genes que codifican para el AgRP y el POMC fueron medidos en el cerebro ratones hiperglucémicos, no-obesos (*Ins<sup>2Akita</sup>*), que también exhiben un perfil ansiogénico tanto en el EPM como en el campo abierto, se encontró que los niveles del ARNm para el POMC estaban significativamente disminuidos, mientras que los de la AgRP se encontraban aumentados [Asakawa et al., 2007]. Estas observaciones indican que las vías AgRPérgicas y las POMCérgicas están activadas e inhibidas en los individuos diabéticos, respectivamente. Se ha sugerido por tanto que estos mecanismos pudieran ser blancos terapéuticos potenciales no sólo para el tratamiento de la DM, sino para el de las complicaciones asociadas a ella [Asakawa et al., 2007].
  
- **Sistema CCKérgico.** La participación de este sistema en la mediación de ataques de pánico en humanos y en la manifestación de conductas tipo ansiosas en modelos animales es ampliamente conocida [Hernandez-Gómez et al, 2002; Pérez de la Mora et al., 2007; 2008]. Ratas “diabéticas” tipo OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty, considerado un modelo de DM2 porque dichos animales presentan obesidad moderada, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia en su etapa adulta) carecen del receptor CCK-1 por una anomalía genética. Estos animales al ser sometidos a pruebas conductuales de ansiedad, como el EPM, la caja luz-obscuridad, el OFT y la neofobia alimentaria muestran un perfil ansiogénico al ser comparadas con ratas control (LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka). Lo anterior apoya la participación de estos receptores en los mecanismos neurobiológicos de la ansiedad en individuos diabéticos [Yamamoto, et al. 2000; Li, et al. 2002].
  
- **Sistema GABAérgico.** Es bien sabido que la disfunción GABAérgica es un factor importante en la patogénesis de la ansiedad [Petty et al., 1993] y la depresión [Petty et al., 1995] y que ésta está relacionada con la acción de algunos agentes ansiolíticos, como las benzodiazepinas [Rodríguez y Contreras, 1998]. Los trabajos de Ramanathan et al., (1998) y Kamei et al. (2001), mostraron evidencias de que roedores “diabéticos” al ser tratados con diazepam y sometidos a diversas pruebas conductuales de ansiedad, exhiben un efecto atenuado; es decir, requerían de dosis más altas del fármaco para observar el efecto ansiolítico que éste produce. Más recientemente Kamei y su grupo han sugerido que los ratones diabéticos pueden presentar una disfunción GABAérgica asociada a una función anormal de los receptores a benzodiazepinas (GABA-A), alteración que puede ser en parte la causante del incremento de conductas tipo-ansiosas y/o tipo-depresivas en estos animales [Miyata, et al. 2005].

▪ **Sistema Serotoninérgico.** Es bien aceptada la participación de este sistema en la neurobiología de la depresión y la ansiedad. Estudios de microdiálisis realizados en el hipotálamo ventromedial de ratas “diabéticas” han revelado un incremento en los niveles extracelulares de este neurotransmisor [Ohtani et al., 1997], que pudieran estar involucrados en estas patologías psiquiátricas. Más recientemente Abraham y colaboradores (2010) reportaron distintas alteraciones en el sistema serotoninérgico presente en las neuronas hipocampales de ratas tratadas con STZ, tales como: una disminución en el contenido de 5-HT acompañado de un incremento de sus metabolitos (5HIAA) y su tasa de recambio (5HIAA/5-HT); una disminución en los niveles de ARNm tanto de sus receptores tipo 5-HT<sub>2A</sub>, como de su transportador (5-HTT), y cambios en los parámetros de Bmax y Kd para los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, que se encuentran disminuidos e incrementados, respectivamente. Por otro lado, al examinar los efectos de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (fluoxetina y fluvoxamina) en ratones tratados con STZ y sometidos a una prueba conductual para estudiar la depresión (prueba de suspensión de la cola), se observó que estos fármacos producían un efecto anti-depresivo atenuado en los ratones diabéticos en comparación con los controles, lo que podría sugerir una alteración de este mecanismo de neurotransmisión en los sujetos diabéticos [Kamei, et al. 2003]. Es interesante también que en ratas tratadas con STZ, el tratamiento crónico con cromo picolinato (CrP) (micronutriente esencial para una óptima actividad insulínica y con propiedades ansiolíticas y anti-depresivas) tuvo un efecto ansiolítico al someter a estos animales en el EPM. Los autores de este trabajo han sugerido que este resultado pudiera estar relacionado con los efectos que el CrP tiene sobre la transmisión serotoninérgica, pues dicho compuesto incrementa los niveles de triptófano libre (precursor de la síntesis de serotonina) en el cerebro de las ratas [Khanam et al., 2007].

▪ **Sistema Dopaminérgico.** Entre las explicaciones que se han dado a las modificaciones emocionales y conductuales presentes en los individuos diabéticos, una de las más estudiadas ha sido la alteración del funcionamiento del sistema de neurotransmisión dopaminérgico. Estudios post mórtem han demostrado que el cerebro de pacientes diabéticos muestra un incremento en el contenido de DA en el hipotálamo medial y en el caudado putamen [Lackovic et al., 1990]. Usando ratas tratadas con STZ, Lim y col. (1994) reportaron una disminución del metabolismo dopaminérgico en el estriado en animales tratados con STZ; mientras que Figlewics y col. (1996) demostraron una sobre-expresión del ARNm para la tirosina hidroxilasa (la enzima limitante de la síntesis de DA) en el AVT del cerebro de roedores tratados de esta misma manera. Aunado a esto, Shankar y col. (2007), usando el modelo de STZ, reportaron una disminución del contenido de DA en regiones tales como el hipotálamo y el tallo cerebral. Recientemente, Robinson y col. (2009), usando también el modelo de DM inducida por STZ, reportaron que el metabolismo de DA, así como la expresión del ARNm para sus receptores tipo 1 y 2, se encuentra incrementada en el hipocampo de las ratas que conforman el grupo experimental, en comparación con los animales control. Tales alteraciones han sido propuestas como responsables de las deficiencias cognitivas y de memoria que se observan en los animales “diabéticos” [Robinson, et al., 2009]. Aunque todos los estudios mencionados en esta sección apuntan a que los individuos diabéticos presentan severas alteraciones en el sistema dopaminérgico en distintas regiones del cerebro, poco se conoce del papel que

juega este sistema en la amígdala, una de las regiones que, como se señaló antes, juega un papel preponderante en la modulación de la ansiedad. Los resultados del grupo de Hajnal (1997) sugieren sin embargo, que el sistema dopaminérgico amigdalino posee un papel importante en la modulación de la ansiedad y que es susceptible de ser afectado en la DM. Mediante el empleo de técnicas de microdiálisis, dichos investigadores demostraron que los niveles de DA aumentaron en el CeA en respuesta al consumo de alimento y a la inyección intraperitoneal de glucosa, en tanto que disminuyeron tras la administración periférica de insulina. Es posible entonces que, dado su papel ansiogénico en la modulación amigdalina de la ansiedad, cambios en la liberación de dopamina dentro de esta región a consecuencia de la hiperglucemia característica de la DM, sean capaces de producir o al menos de influir en el aumento de ansiedad que se observa en la diabetes.

## 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, tanto la ansiedad, como la diabetes y el síndrome metabólico son enfermedades que causan un gran impacto en los asuntos de salud pública de nuestro país, de ahí la importancia de que tanto su naturaleza intrínseca, como la relación existente entre ellas sean investigadas en la actualidad. A pesar de que estas son entidades distintas, hoy conocemos que tanto en la clínica, como a nivel experimental, existe una relación entre ellas, cuya naturaleza no ha sido bien caracterizada.

La mayoría de los estudios en animales donde se ha estudiado la relación diabetes-ansiedad han sido realizados en roedores tratados con STZ, que modela la diabetes tipo 1, o en ratones modificados genéticamente (transgénicos), que simulan algunas de las condiciones que se presentan en la diabetes mellitus tipo 2. A pesar de su uso cada vez más difundido, la utilidad de los modelos transgénicos puede cuestionarse en este tipo de estudios, debido a que algunos de ellos pueden alterar la expresión de moléculas que tienen un efecto directo sobre la conducta, como la leptina [Asakawa et al., 2003; Finger et al., 2010; Liu et al., 2010 y 2011]. Por lo anterior, es de crucial relevancia estudiar los efectos de las alteraciones de la DM y el SM sobre la ansiedad en un modelo animal que simule de una manera más “fisiológica” el progreso de los trastornos metabólicos que ocurren en el desarrollo de estos padecimientos, como es el caso de los animales tratados con sacarosa al 20%, utilizado en este trabajo.

Por otro lado, aunque el sistema de neurotransmisión dopaminérgico ha sido estudiado en distintas regiones cerebrales (estriado, hipotálamo, núcleo accumbens, área ventral tegmental, hipocampo, entre otras) en animales tratados con STZ, aún no se conocen las alteraciones que se pudieran producir en el sistema dopaminérgico en estructuras cerebrales que están tan estrechamente involucradas con el procesamiento del miedo y la ansiedad, como lo es la amígdala. Así, el presente trabajo contribuirá en profundizar en los mecanismos dopaminérgicos intra-amigdalinos que pudieran estar participando en el incremento de ansiedad presente en los individuos tratados con STZ. Además, el hecho de utilizar dos tipos de modelos animales de trastornos metabólicos hiperglucemiantes (animales tratados con STZ vs. animales tratados con sacarosa al 20%), nos permitirá conocer y comparar los efectos producidos por estos trastornos metabólicos de una manera más detallada.

Consideramos que de esta forma, podremos mejorar nuestra comprensión acerca de las diferencias o similitudes que existen en las alteraciones que están involucradas en el incremento de los trastornos de ansiedad en los enfermos que padecen DM y SM, conocimiento que podría repercutir posteriormente en un manejo clínico más adecuado en estos pacientes.

## **HIPOTESIS**

### **a. Animales tratados con estreptozotocina (STZ)**

Considerando que la corteza cerebral ejerce un férreo control inhibitorio sobre la actividad de la amígdala que le impide generar respuestas ansiosas y que este es removido o al menos amortiguado merced a la actividad de los receptores D1 intra-amigdalinos, es posible sugerir que en la diabetes este mecanismo se encuentra exacerbado y, que de esta manera, se facilita la aparición de conductas de miedo y ansiedad en los individuos “diabéticos”. Como consecuencia de lo anterior se podría hipotetizar que, de existir un estado exacerbado del sistema dopaminérgico dentro de la amígdala de los animales diabéticos, el bloqueo de sus los receptores D1 intra-amigdalinos les provocará una disminución en sus niveles de ansiedad.

### **b. Animales sometidos a una dieta hipercalórica (solución de sacarosa al 20%)**

Considerando que tanto en los animales tratados con STZ, como en modelos transgénicos de DM y/o SM se ha observado un perfil ansiogénico y que en animales sometidos a una dieta rica en grasas también se ha observado un incremento de ansiedad, se puede hipotetizar que los animales sometidos a una alimentación hipercalórica (ingestión de sacarosa al 20% por 6 meses) mostrarán también un aumento en sus niveles basales de ansiedad en los distintos paradigmas conductuales que se van a utilizar.

## **OBJETIVOS**

### **a. Modelo animal de diabetes (animales tratados con estreptozotocina)**

El objetivo principal con este modelo animal de diabetes utilizado en este trabajo es examinar si alteraciones en el sistema dopaminérgico intra-amigdalino subyacen el aumento en la ansiedad que se observa en la DM.

### **Objetivos particulares**

1. Establecer las condiciones experimentales adecuadas para estudiar la relación DM-ansiedad, haciendo uso del modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ).
2. Confirmar si la diabetes inducida por STZ en ratas Wistar macho produce una conducta ansiosa en distintos paradigmas de ansiedad no-condicionados: el laberinto elevado en forma de "+", el campo abierto y el enterramiento defensivo.
3. Determinar si el estado hiper-ansioso que se observa en la diabetes es bloqueado o al menos disminuido tras el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1.
4. Relacionar los posibles cambios en el sistema dopaminérgico con el estado conductual de los animales.

#### **b. Modelo animal de Síndrome Metabólico (animales sometidos a una dieta hipercalórica, i.e., solución de sacarosa al 20%)**

El objetivo principal utilizando este modelo animal de SM estudiado en este trabajo es examinar si existen alteraciones conductuales asociadas al estado metabólico que los animales presentan por la ingestión de una solución de sacarosa al 20% de manera crónica

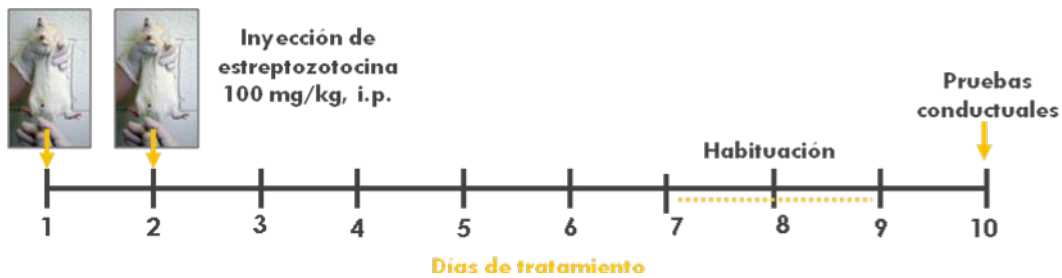
### **Objetivos particulares**

1. Establecer las condiciones experimentales adecuadas para estudiar la relación SM-ansiedad, haciendo uso del modelo de ingestión de la dieta hipercalórica (solución de sacarosa al 20% por 6 meses).
2. Confirmar si la ingestión de una solución de sacarosa al 20% por 6 meses en ratas Wistar macho produce una conducta ansiosa en distintos paradigmas de ansiedad no-condicionados: el laberinto elevado en forma de "+", el campo abierto y el enterramiento defensivo.
3. Relacionar los posibles cambios conductuales con el estado metabólico que los animales presentan.

### 3. METODOLOGÍA

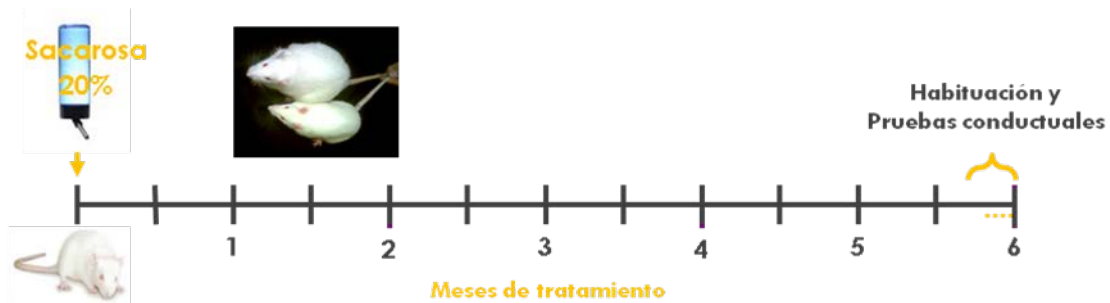
#### -Modelo animal de diabetes: animales tratados con estreptozotocina

Ratas Wistar, macho de 240-250g fueron inyectadas intra-peritonealmente con estreptozotocina (Sigma Aldrich) usando una dosis total de 100 mg/kg (dividida en dos inyecciones de 50 mg/kg, realizadas en dos días consecutivos), como se ha descrito previamente [Vilchis y Salceda, 1996]. Los controles fueron inyectados con el vehículo exclusivamente (buffer de citratos 90 mM, pH 4.8). Los animales fueron sometidos a las pruebas conductuales 10 días posteriores a la primera inyección.



#### -Modelo animal de Síndrome Metabólico: animales sometidos a una dieta hipercalórica (solución de sacarosa al 20%)

A ratas Wistar macho de 250 g se les dio a beber una solución de sacarosa al 20% durante 6 meses, mientras que a los controles se les dio a beber únicamente agua de acuerdo a Velasco et al., 2012. Los animales sometidos a este tratamiento fueron probados conductualmente después de 6 meses de haberlo iniciado.



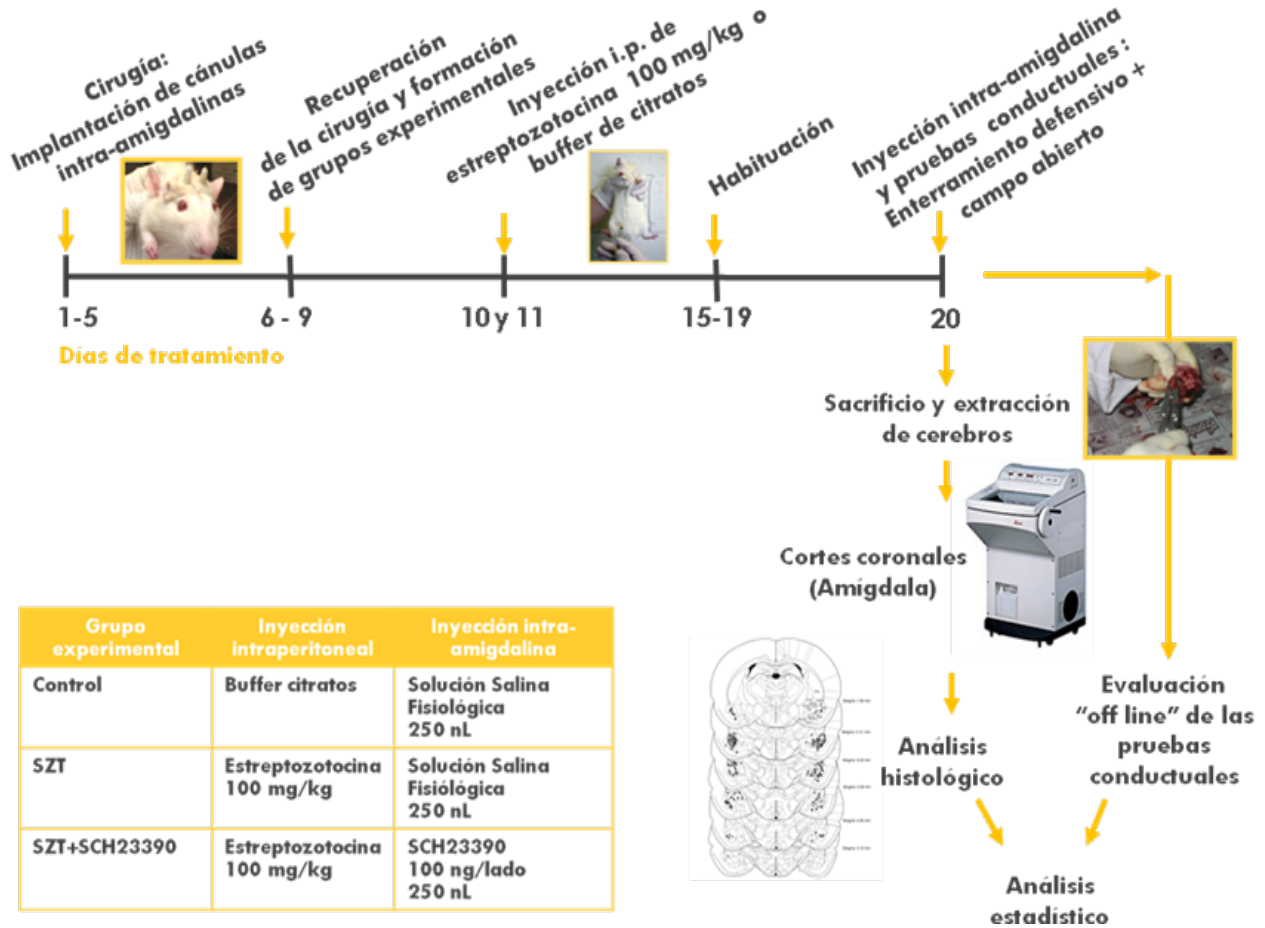


a. Pruebas conductuales:

Prueba conductual	Características
<p data-bbox="280 373 657 401"><b>Laberinto elevado en forma de “+”</b></p> 	<p data-bbox="743 331 1101 359"><b>Duración de la prueba:</b> 5 minutos</p> <p data-bbox="743 373 1442 485"><b>Dimensiones del aparato:</b> brazos abiertos 50x10 cm; brazos cerrados 50x10x40 cm; plataforma central 10x10cm; altura del piso: 50 cm.</p> <p data-bbox="743 499 1076 527"><b>Intensidad de la luz:</b> 2.3-2.5 lux</p> <p data-bbox="743 541 1398 611"><b>Parámetros de ansiedad medidos:</b> no.de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto.</p> <p data-bbox="743 625 1409 695"><b>Parámetros de locomoción medidos:</b> no. total de entradas a los brazos abiertos y cerrados del laberinto</p>
<p data-bbox="386 789 553 816"><b>Campo abierto</b></p> 	<p data-bbox="743 747 1101 774"><b>Duración de la prueba:</b> 5 minutos</p> <p data-bbox="743 789 1455 816"><b>Dimensiones del aparato:</b> arena central: 50 x 50 cm; paredes 30 cm.</p> <p data-bbox="743 831 1044 858"><b>Intensidad de la luz:</b> 175 lux</p> <p data-bbox="743 873 1430 942"><b>Parámetros de ansiedad medidos:</b> tiempo de permanencia en los cuadros centrales de la arena y tiempo de congelamiento.</p> <p data-bbox="743 957 1455 1068"><b>Parámetros de locomoción medidos:</b> locomoción horizontal (no. de veces que el animal cruza los cuadros de la arena) y locomoción vertical (no. de levantamientos en las patas traseras)</p>
<p data-bbox="329 1205 609 1232"><b>Enterramiento defensivo</b></p> 	<p data-bbox="743 1163 1117 1190"><b>Duración de la prueba:</b> 10 minutos</p> <p data-bbox="743 1205 1430 1274"><b>Dimensiones del aparato:</b> caja de 27x16x23 cm; electrodo de 7cm longitud x 0.5 diámetro</p> <p data-bbox="743 1289 1170 1316"><b>Intensidad del choque eléctrico:</b> 0.4 mA</p> <p data-bbox="743 1331 1076 1358"><b>Intensidad de la luz:</b> 2.3-2.5 lux</p> <p data-bbox="743 1373 1446 1484"><b>Parámetros de ansiedad medidos:</b> tiempo de latencia (tiempo que pasa entre el primer choque y la primer conducta de enterramiento), tiempo total de enterramiento y no. total de choques recibidos.</p>

**Nota:** si se quiere consultar con detalle las características de las pruebas conductuales utilizadas en esta parte del proyecto, ir al anexo 2.

**b. Inyección intra-admigdalina de SCH23390, antagonista de receptores D1 en animales tratados con estreptozotocina**



**Nota:** si se quiere consultar con detalle las características de la metodología empleada para esta parte del proyecto, ir al anexo 3.

**Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se evaluaron haciendo uso del paquete de cómputo GraphPad Prism versión 5. Se llevaron a cabo pruebas de t de Student, no pareadas, de dos colas cuando se compararon dos grupos experimentales distintos mientras que para comparar tres, se realizaron pruebas de ANOVA de una vía con análisis posthoc de Tukey. Se determinó una significancia estadística con valores de  $p < 0.05$ .

## EVALUACIONES CONDUCTUALES

### A) ANIMALES TRATADOS CON ESTREPTOZOTOCINA

#### A1. Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la glucemia, el peso corporal y el consumo de agua y alimento

Como lo muestra la tabla A1, los animales tratados con STZ y probados 10 días después de haberse iniciado el tratamiento presentaron síntomas similares a los de la condición diabética del humano, tales como una disminución del peso corporal, un incremento en la ingesta de agua (polidipsia) y alimento (polifagia), así como en el número de micciones (poliuria, no cuantificado). También se registró un aumento de casi 5 veces en los niveles de glucosa sanguínea (hiperglucemia) con respecto a los animales del grupo control.

**TABLA A1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA SOBRE EL PESO CORPORAL, NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE Y EL CONSUMO DE AGUA Y ALIMENTO**

PARÁMETRO	VEHÍCULO	STZ (100 mg/kg)
GLUCOSA <sup>a</sup> (mg/dL)	130±4.5	530±14***
PESO (g)	320±6.4	240±5.5***
	n=22	n=22
CONSUMO DE AGUA (ml)	41±0.98	100±11***
CONSUMO DE ALIMENTO (g)	21±0.54	26±1.9*
	n=9	n=9

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \* p<0.05, \*\*\* p<0.0001 (Vehículo VS. STZ);

#### A2. Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la conducta de la rata en el laberinto elevado en forma de "+" (EPM, por sus siglas en inglés elevated-plus maze)

Como puede verse en la tabla A2, al evaluarse la exploración de los animales en el EPM se encontró que las ratas tratadas con STZ al compararse con sus controles, mostraron un aumento significativo tanto en el número de visitas a sus brazos abiertos, como en el tiempo que estos animales permanecían en ellos. Dicho efecto, no fue provocado por una alteración en la locomoción de los animales, dado que no se observaron cambios significantes en el número total de entradas a ambos brazos (abiertos+cerrados) del laberinto (Tabla A2).

**TABLA A2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA CONDUCTA DE LA RATA EN EL LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE “+”**

PARÁMETRO	VEHÍCULO	STZ (100 mg/kg)
TIEMPO EN BRAZOS ABIERTOS (s)	19±3.2	41±6.7**
% ENTRADAS A BRAZOS ABIERTOS	5.9±0.9	10±1.3*
NO. ENTRADAS TOTALES	30±2.1	28±2.1
	n=22	n=22

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \* p<0.05, \*\* p<0.005 (Vehículo VS.STZ).

### **A3. Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la conducta de la rata en la prueba de campo abierto (OFT por sus siglas en inglés, Open Field Test)**

Los animales tratados con STZ y que fueron probados en el OFT mostraron una disminución significativa en el tiempo de permanencia en los cuadros centrales vs. los cuadros periféricos de la arena. Asimismo, se observó un incremento estadísticamente significativo en la duración de la conducta de congelamiento en comparación con los animales que fueron inyectados únicamente con el vehículo (Tabla A3).

**TABLA A3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA CONDUCTA DE LA RATA EN LA PRUEBA DE CAMPO ABIERTO**

PARÁMETRO	VEHÍCULO	STZ (100 mg/kg)
TIEMPO EN CUADROS CENTRALES (s)	18±3.4	5.9±1.2***
TIEMPO EN CONGELAMIENTO (s)	7.5±1.7	52±7.8***
	n=22	n=22

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \* p<0.05, \*\* p<0.005 y \*\*\* p<0.0001 (Vehículo VS. STZ).

### **A4. Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la locomoción medida en el campo abierto**

La locomoción de los animales tratados con STZ medida en el OFT abierto mostró una disminución significativa tanto en su componente vertical (levantamientos en sus patas traseras), como en el horizontal (el número de veces que el animal cruza los cuadros en la superficie del campo abierto) cuando esta fue comparada con la exhibida por sus controles respectivos (Tabla A4).

**TABLA A4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA LOCOMOCIÓN DE LAS RATAS MEDIDA EN EL CAMPO ABIERTO**

PARÁMETRO	VEHÍCULO	STZ (100 mg/kg)
LOCOMOCIÓN HORIZONTAL	340±15	200±13***
LOCOMOCIÓN VERTICAL	27±3.1	13±1.9***
	n=22	n=22

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \*\*\* p<0.0001 (Vehículo VS. STZ).

**A5. Efecto del tratamiento con estreptozotocina sobre la conducta de la rata en la prueba del enterramiento defensivo**

A diferencia de las ratas control, el tratamiento con STZ, a pesar de que no tuvo efectos en la conducta de enterramiento, produjo un aumento significativo en el tiempo que los animales pasaron cogelados/inmóviles en esta prueba; sin modificarse estadísticamente ni la latencia, ni el tiempo total de enterramiento. Tampoco se registraron cambios entre los grupos experimentales en el número de choques recibidos durante la prueba (Tabla A5).

**TABLA A5. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTREPTOZOTOCINA SOBRE LA CONDUCTA DE LA RATA EN LA PRUEBA DEL ENTERRAMIENTO DEFENSIVO**

PARÁMETRO	VEHÍCULO	STZ (100 mg/kg)
NO. CHOQUES	7±1	8±1
TIEMPO DE LATENCIA (s)	58±7.8	109±33
TIEMPO DE ENTERRAMIENTO (s)	27±8.5	35±9.3
TIEMPO DE CONGELAMIENTO (s)	37±11	97±17**
	n=24	n=24

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \*\* p<0.005; † tendencia estadísticamente significativa (Vehículo VS. STZ).

## **INYECCIÓN INTRA-AMIGDALINA DEL ANTAGONISTA DOPAMINÉRGICO SCH23390 EN ANIMALES TRATADOS CON ESTREPTOZOTOCINA**

### **A. ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

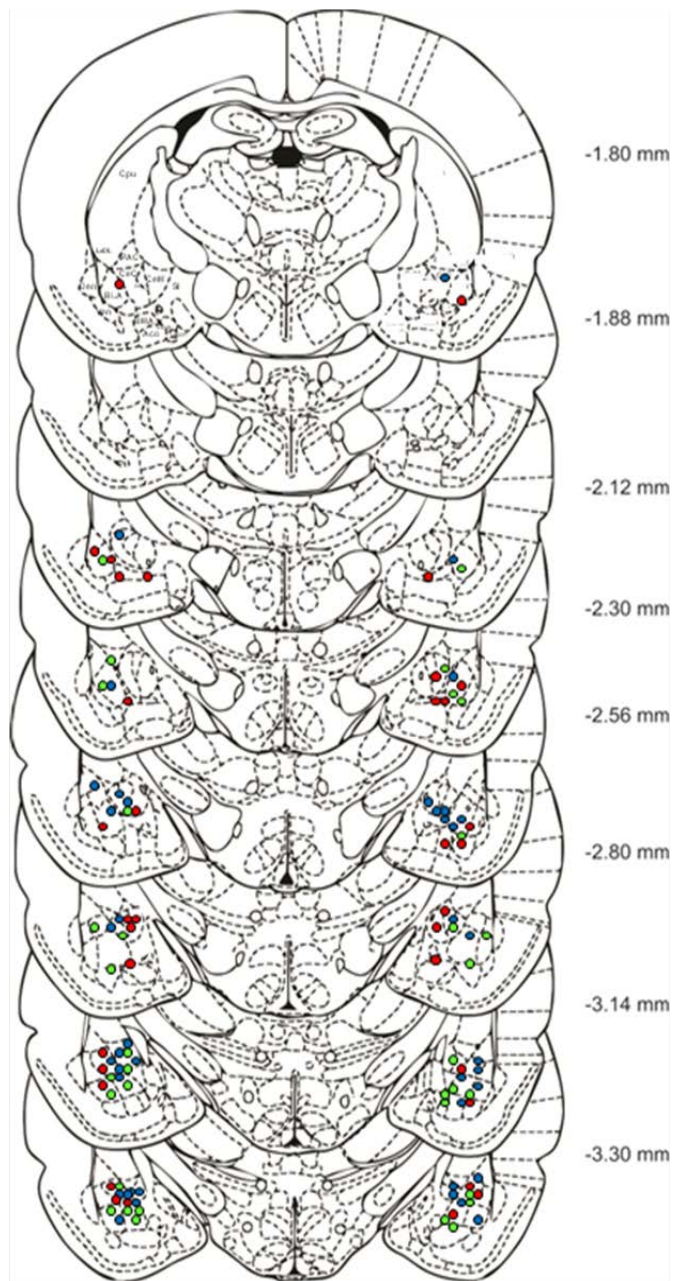
Con el objetivo de localizar el sitio de la implantación de las cánulas, se realizaron mediante un criostato secciones coronales de 50  $\mu\text{m}$  en cada uno de los cerebros de los animales estudiados. Sólo los animales en los que ambas cánulas estuvieron localizadas en la amígdala, fueron incluidos en el análisis.

Como se observa en la Figura 7 de esta sección, la mayor parte de las cánulas se encontraron entre el bregma -2.3 y -3.3 mm del Atlas Estereotáxico de Paxinos y Watson; encontrándose solo algunas de ellas en niveles más anteriores. No se encontraron sin embargo cánulas implantadas en posiciones anteriores a -1.8mm del bregma, ni posteriores a -3.30mm del mismo así como en las regiones corticales amigdalinas (Fig.7). Como se puede ver en dicha figura, la mayoría de las cánulas se localizaron bilateralmente sobre los núcleos central y basolateral de la amígdala.

### **B. ANÁLISIS CONDUCTUAL**

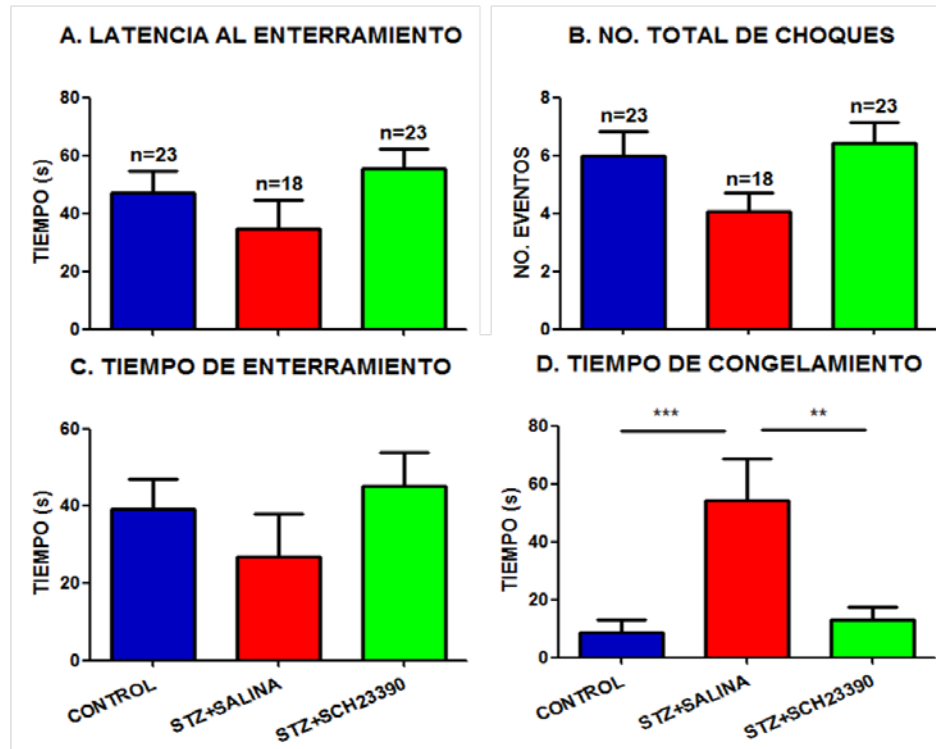
Como se mencionó en la sección "A5" de los resultados, los animales tratados con STZ y probados en la prueba de enterramiento defensivo 10 días posteriores al inicio del tratamiento, mostraron un incremento significativo en el tiempo que pasaron inmóviles ó congelados en esta prueba, cuando fueron comparados con los animales inyectados con el vehículo únicamente. En contraste, la inyección intra-amigdalina del SCH23390 (antagonista dopaminérgico selectivo para los receptores tipo D1) en los animales tratados con STZ produjo una disminución significativa en el tiempo que dichos animales mostraron una conducta de congelamiento, al compararse con ratas que fueron inyectadas con solución salina como control (Fig. 8). Los demás parámetros cuantificados en esta prueba, como son la latencia al enterramiento, el tiempo total de enterramiento y el no. de choques permanecieron sin cambios estadísticamente significativos entre los grupos estudiados (Figuras 2A, 2B y 2C).

La locomoción, como se puede observar en la Figura 9, no mostró asimismo cambios significativos entre los distintos grupos estudiados, en su componente horizontal (no. total de cruces en los cuadros del campo abierto) medida en la prueba de campo abierto.



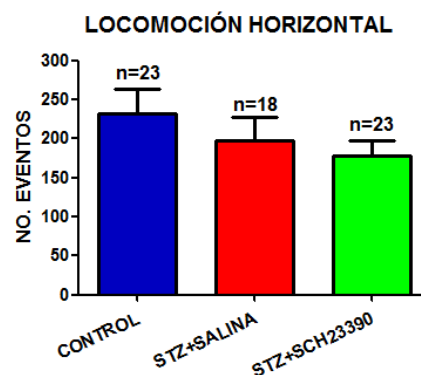
**Figura 7. Representación esquemática en la que se muestra el sitio de implantación de las cánulas intra-amigdalinas bilaterales colocadas en animales tratados con estreptozotocina o inyectados con el vehículo.**

Las secciones de la amígdala fueron tomadas del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998) a los niveles del Bregma señalados en la figura. **Círculos azules: Control (Vehículo+Solución salina, n=23);** **Círculos rojos: STZ+Solución Salina (n=18);** **Círculos verdes: STZ+SCH23390 (n=23).** Abreviaturas: BLA: núcleo basolateral amigdalino; BMA: núcleo basomedial amigdalino; CeC: núcleo central amigdalino (división lateral-capsular); CeM: núcleo central (división medial); Cpu: caudado putamen; CxA: zona de transición amigdalocortical; Den: núcleo endopiriforme dorsal; LaDL: núcleo dorsolateral amigdalino, dorsolateral; MeAD: núcleo mediodorsal amigdalino; SI: sustancia innominata; Ven: núcleo endopiriforme ventral.



**Figura 8. Parámetros conductuales medidos en la prueba de enterramiento defensivo**

Ratas Wistar macho fueron sometidas a cirugía para implantar cánulas intra-amigdalinas bilaterales; posteriormente, se inyectaron intraperitonealmente con vehículo o estreptozotocina. Antes de ser evaluadas en la prueba de enterramiento defensivo (10 días posteriores a la inyección i.p.), se inyectó solución salina fisiológica o el antagonista dopaminérgico SCH23390 a través de las cánulas. Las gráficas representan la media±ESM de los valores medidos: A) Latencia al enterramiento, B) no. total de choques recibidos durante la prueba C) tiempo total que el animal pasó realizando conducta de enterramiento y D) tiempo total en que el animal pasó realizando conducta de congelamiento. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía, con análisis post-hoc de Tukey y se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ . Los números encima de las barras indican el tamaño de la muestra en cada uno de los grupos experimentales.



**Figura 9. Actividad locomotora medida en la prueba de campo abierto**

Ratas Wistar macho fueron tratadas como se describe en la Fig. 8. La actividad locomotora fue medida inmediatamente después de la prueba de enterramiento defensivo. La gráfica de barras representa la media±ESM de los valores de locomoción horizontal (no. total de cruces en los cuadros del campo abierto). Se realizó una prueba de ANOVA de una vía, con análisis post-hoc de Tukey y se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de  $p < 0.05$ ; los números encima de las barras indican el tamaño de la muestra en cada uno de los grupos experimentales.



## B) ANIMALES SOMETIDOS A UNA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA (SOLUCIÓN DE SACAROSA AL 20%)

### B1. Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la glucemia y otros parámetros metabólicos

En la Tabla B1 se muestran los parámetros metabólicos obtenidos en ratas alimentadas durante seis meses con una dieta hipercalórica a base de sacarosa al 20 %, y que fueron utilizadas en este estudio. Cabe señalar que bajo esta manipulación dietética los animales desarrollaron desde los dos meses de haber iniciado la ingesta de la solución de sacarosa: sobrepeso, incremento del índice de masa corporal (IMC), obesidad central, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión (datos no mostrados). Al final del tratamiento (6 meses), aparte de lo anterior, se añadió la presencia de una hiperglucemia moderada (Tabla B1).

**TABLA B1. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA SOBRE EL PESO, CONCENTRACION SANGUINEA DE GLUCOSA, CONSUMO DE AGUA Y ALIMENTO Y OTROS PARÁMETROS METABÓLICOS**

PARÁMETRO	CONTROL	SACAROSA 20%	TAMAÑO DE LA MUESTRA
GLUCOSA <sup>a</sup> (mg/dL)	190±11	240±21*	40
PESO (g)	560±12	680±19***	70
LONGITUD (cm)	27.3±0.2	27.4±0.2	70
ÍNDICE DE MASA CORPORAL (Kg/m) <sup>2</sup>	4.1±0.2	6.3±0.2***	70
CIRCUNFERENCIA ABDOMINAL (cm)	22.4±0.4	25.1±0.4***	70
GRASA ABDOMINAL <sup>a</sup> (g)	5.4±0.7	17.3±0.7***	70
PRESIÓN ARTERIAL <sup>b</sup> (mmHg)	124.9±2.6	134.3±3.9*	20
FRECUENCIA CARDIACA <sup>b</sup> (latidos/min.)	340.7±9.8	362.4±9.6	20
TRIGLICÉRIDOS <sup>a</sup> (mg/dL)	43±6	74±9***	40
INSULINA <sup>a</sup> (mg/dL)	4.5±0.4	8.4±0.8***	40
LEPTINA <sup>c</sup>	5685±733	25300±3274***	32
RESISTINA <sup>c</sup>	13±0.6	28±1.4***	32
CONSUMO DE AGUA (ml)	55±2.4	96±3.5***	20
CONSUMO DE ALIMENTO (g)	24±1.1	7.7±0.45***	20

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \* p<0.05, \*\*\* p<0.0001 (Control VS. Sacarosa 20%);

<sup>a</sup> Datos obtenidos en el grupo de la Dra. Hiriart (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

<sup>b</sup> Datos obtenidos en el grupo del Dr. Hong (Depto. De Farmacobiología, CINVESTAV SUR).

<sup>c</sup> Datos obtenidos en el grupo del Dr. Guillermo Robles (Facultad de Medicina, UNAM).

La presencia de los trastornos metabólicos mencionados con anterioridad sugiere de acuerdo a Velasco y colaboradores (2012) el desarrollo de un síndrome metabólico en estos animales, acompañado muy probablemente de un estado “pre-diabético”, similar al que se observa en los pacientes con DM tipo 2.

De acuerdo a la Tabla B1, podemos observar que los niveles plasmáticos de las hormonas derivadas del tejido adiposo: leptina y resistina se encuentran también significativamente aumentadas en los animales tratados con sacarosa. Fue también posible observar que los animales sometidos al tratamiento con sacarosa durante 6 meses disminuyeron de manera significativa el consumo de alimento, mientras que el consumo de agua se incrementó al compararse con sus respectivos controles.

## **B2. Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la conducta de la rata en la prueba de laberinto elevado en forma de “+” (EPM)**

Los animales alimentados con una solución de sacarosa por 6 meses y sometidos a la exploración del EPM, no mostraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros medidos en este paradigma conductual. Así, ni el número de visitas a los brazos abiertos, ni el tiempo que los animales permanecieron en ellos fue modificado (Tabla B2) en el grupo experimental al compararse con el control. Tampoco se observaron cambios significativos en el número de entradas totales a los brazos abiertos y cerrados del laberinto (Tabla B2). Cabe hacer mención, que para que los animales pudieran moverse libremente en el laberinto éste tuvo que tener dimensiones especiales, (13 cm. de ancho) dado que con las medidas convencionales (10 cm. de ancho) los animales se quedaban “atorados” en los brazos cerrados del laberinto a causa de su obesidad (datos no mostrados).

**TABLA B2. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA SOBRE LA CONDUCTA DE LA RATA EN EL LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE “+”**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CONTROL</b>	<b>SACAROSA 20%</b>
TIEMPO EN BRAZOS ABIERTOS (s)	15±3.2	7.2±3.1
% ENTRADAS A BRAZOS ABIERTOS	6.2±1.3	3.0±1.4
NO. ENTRADAS TOTALES	26±2.1	23±2.0
	n=27	n=24

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas (Control vs. Sacarosa 20%).

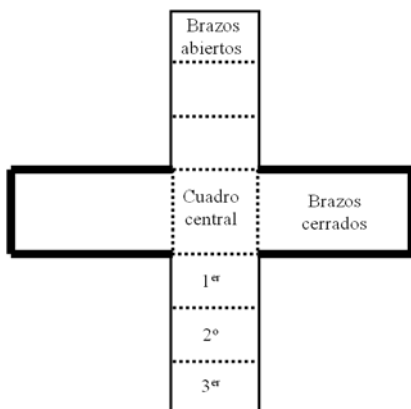
### B3. Análisis de la conducta de la rata sometida a una alimentación hipercalórica en el laberinto elevado en forma de “+”

Como puede observarse en la Tabla B3, las ratas sometidas a la alimentación hipercalórica mostraron en el EPM una menor exploración del laberinto, en comparación con los animales del grupo control. Además, el número de animales que exploró el segundo y el tercer cuadrante de los brazos abiertos de este dispositivo fue menor en el grupo experimental que en el grupo control. Estos datos, en conjunto con los mostrados en la tabla B2, dejan ver que los animales que recibieron una alimentación hipercalórica exhiben una tendencia a disminuir el tiempo y número de entradas a los brazos abiertos del laberinto en comparación con los controles.

**TABLA B3. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA CONDUCTA DE LA RATA SOMETIDA A UNA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA EN EL LABERINTO ELEVADO EN FORMA DE “+”**

PARÁMETRO	CONTROL n=27	SACAROSA 20% n=24
No. de animales que exploraron los brazos abiertos del EPM	15 (55.6%)	7 (29.2%)
No. de animales que entraron al primer cuadrante de los brazos abiertos del EPM	15 (55.6%)	7 (29.2%)
No. de animales que entraron al segundo cuadrante de los brazos abiertos del EPM	14 (51.9%)	6 (25%)
No. de animales que entraron al tercer cuadrante de los brazos abiertos del EPM	7 (25.9%)	2 (8.3%)

**Nota:** El análisis cualitativo se llevó a cabo basándonos en la disposición de los brazos del EPM de acuerdo al siguiente diagrama:



#### **B4. Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la conducta de la rata en la prueba de campo abierto.**

Como puede observarse en la Tabla B4, las ratas sometidas a una dieta hipercalórica durante 6 meses permanecieron significativamente por más tiempo en un estado de congelación que las ratas mantenidas bajo un régimen calórico estándar. Aunado a este efecto, el tiempo de exploración de los cuadrantes centrales vs. los cuadrantes periféricos del dispositivo usado en esta prueba fue significativamente menor en las ratas tratadas en comparación con sus controles. Cabe mencionar que dicho efecto, fue dependiente del tiempo que recibieron los animales la sacarosa, pues no se observó cambio alguno sobre estos parámetros a los 2 y 3 meses del tratamiento (datos no mostrados).

**TABLA B4. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA SOBRE LA CONDUCTA DE LA RATA EN LA PRUEBA DE CAMPO ABIERTO**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CONTROL</b>	<b>SACAROSA 20%</b>
TIEMPO EN CUADROS CENTRALES (s)	38±7.5	16±3.0**
TIEMPO EN CONGELAMIENTO (s)	39±7.4	66±6.5*
	n=25	n=25

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \* p<0.05, \*\* p<0.005 y \*\*\* p<0.0001 (Control VS. Sacarosa 20%).

#### **B5. Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la locomoción medida en el campo abierto**

La locomoción de las ratas tratadas con una solución de sacarosa al 20% medida en el campo abierto, no mostró ningún cambio estadísticamente significativo en ninguno de sus componentes (horizontal y vertical) en comparación con sus respectivos controles (Tabla B5).

**TABLA B5. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA SOBRE LA LOCOMOCIÓN DE LAS RATAS MEDIDA EN EL CAMPO ABIERTO**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CONTROL</b>	<b>SACAROSA 20%</b>
LOCOMOCIÓN HORIZONTAL	590±31	510±62
LOCOMOCIÓN VERTICAL	160±21	120±22
	n=25	n=25

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \*\*\* p<0.0001 (Control VS. Sacarosa 20%).

## B6. Efecto de la alimentación hipercalórica sobre la conducta de la rata en la prueba del enterramiento defensivo

En la prueba de enterramiento defensivo los animales tratados con la solución de sacarosa mostraron un incremento en el tiempo total de enterramiento, en comparación a los animales que ingirieron una dieta estándar. No se observaron, sin embargo, cambios estadísticamente significantes en la latencia al enterramiento, el tiempo de congelamiento, ni en el número total de choques recibidos entre los grupos experimentales (Tabla B6).

**TABLA B6. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA SOBRE LA CONDUCTA DE LA RATA EN LA PRUEBA DEL ENTERRAMIENTO DEFENSIVO**

PARÁMETRO	CONTROL	SACAROSA 20%
NO. CHOQUES	6.9±0.9	9.3±1.1
TIEMPO DE LATENCIA (s)	59±11	47±7.2
TIEMPO DE ENTERRAMIENTO (s)	56±8.6	93±15*
TIEMPO DE CONGELAMIENTO (s)	17±6	36±9.4
	n=20	n=20

Promedio ± ESM; t-Student no pareada, dos colas; \* p<0.05 (Control VS. Sacarosa 20%).

Los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando paradigmas experimentales que modelan en ratas signos compatibles tanto de ansiedad como de trastornos metabólicos (diabetes y/o síndrome metabólico), sugieren que podría existir, como ha sido reportado por otros grupos de investigación [Ramanathan et al., 1998; Yamamoto et al., 2000; Kamei et al., 2001; Li et al., 2002; Asakawa et al., 2007], una relación entre ambos trastornos. Dicha relación parece, sin embargo, depender de las características de los modelos empleados. Los paradigmas experimentales de diabetes y de síndrome metabólico utilizados en este trabajo incluyeron la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos con estreptozotocina (STZ) y la administración crónica de una solución hipercalórica de sacarosa. Los niveles de ansiedad en los animales se midieron en todos los casos usando el EPM en forma de "+" (EPM), el campo abierto (OFT) y el enterramiento defensivo.

### - ANIMALES TRATADOS CON ESTREPTOZOTOCINA

El modelo de diabetes inducida por STZ ha sido extensamente usado en la literatura como un modelo animal de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), debido a que este compuesto tiene la capacidad de destruir las células  $\beta$  pancreáticas [Junod et al., 1969; Szkudelski et al., 2001], generando una condición de hiperglucemia severa en los sujetos experimentales. De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran que existe un incremento en los niveles de azúcar en la sangre de los animales tratados, así como de una pérdida de peso, polidipsia, polifagia y poliuria, indicando que las ratas utilizadas en nuestros experimentos presentaban, como lo reportado por otros autores [Bellush et al., 1994; Barber et al., 2003; Jöhren et al., 2006] alteraciones similares a las presentes en la DM1 del humano.

Es importante mencionar que el transportador GLUT-2 de glucosa, a través del cual se introduce la STZ al interior de las células  $\beta$  pancreáticas, no se expresa en la barrera hematoencefálica [Kumagai et al., 1999], excluyendo la posibilidad de que los efectos de la STZ hayan sido consecuencia de efectos directos en el cerebro y sugieren que estos son secundarios a la condición hiperglucémica producida por su administración.

Usando este modelo experimental los resultados obtenidos en la prueba de OFT (disminución en el tiempo de exploración de los cuadros centrales, así como un incremento en el tiempo que el animal permanece congelado) nos permiten sugerir, como ha sido reportado por otros autores [Thorré et al., 1997; Ramanathan et al., 1998; Kamei et al., 2001], que nuestros animales presentaban un incremento en los niveles de ansiedad, a consecuencia de la condición hiperglucémica producida por el tratamiento con STZ. En vista de lo anterior, no resulta sorprendente que en la prueba de enterramiento defensivo, se haya podido observar un incremento significativo en el tiempo que los animales pasaron congelados en comparación con el grupo inyectado únicamente con el vehículo.

En relación con lo anterior, cabe señalar, que la prueba de enterramiento defensivo es un paradigma de ansiedad que permite observar dos tipos de estrategias de confrontación ante el estímulo ansiogénico que dicha prueba explota (un choque eléctrico proporcionado por un electrodo electrificado): una estrategia activa (conductas de enterramiento) y una estrategia pasiva (conductas evasivas, como el congelamiento) [De Boer y Koolhaas, 2003]. Basado en lo anterior, podemos sugerir que el congelamiento de los animales observado tanto en la prueba de campo abierto, como en la de enterramiento defensivo, representan estrategias pasivas de enfrentamiento ante los estímulos ansiogénicos que emplean estos paradigmas de ansiedad. Nuestros resultados están de acuerdo con reportes previos en los que ratas tratadas con STZ también exhiben conductas pasivas, como son: la evasión de la exploración de los brazos abiertos en el EPM [Thorré et al., 1997; Ramanathan et al., 1998; Jung et al., 2010], la reducción en la exploración de los cuadros centrales del OFT [Ramanathan et al., 1998] o en el número de veces que el animal asoma la cabeza en la prueba del campo abierto con agujeros (“hole-board”) [Kamei et al., 2001]. La conducta pasiva exhibida por los animales estudiados en nuestros experimentos puede estar relacionada con el estado físico tan deteriorado que estos presentan tras de sufrir por 10 días los efectos del tratamiento con la STZ y que se manifiestan por una importante pérdida de peso corporal, así como por la disminución de su locomoción. Es posible que estas conductas pasivas representen un mecanismo de ahorro de energía para afrontar las condiciones adversas a las que son sometidos durante su exposición a las pruebas conductuales. La posibilidad de que el incremento en la conducta de congelamiento observado en nuestros experimentos se deba a efectos inespecíficos ligados al tratamiento con STZ es poco probable, pues es prevenida completamente tras la administración intra-amigdalina del SCH23390, como se discutirá más adelante.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el EPM fueron sorprendentes, puesto que muestran un claro incremento tanto en el número de entradas, como en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto, que sugiere un perfil ansiolítico en estos animales. Estos resultados contrastan no sólo con los obtenidos en nuestro estudio en las otras pruebas conductuales realizadas (campo abierto y enterramiento defensivo), sino también con lo reportado por otros autores, como Ramanathan et al. (1998) y Jung et al. (2010), que utilizando el EPM, encontraron un perfil ansiogénico en roedores hechos diabéticos por la administración de STZ.

Las diferencias entre los resultados de estos grupos de investigación y las nuestras son poco claras, pero podrían deberse a las distintas especies y cepas empleadas, puesto que en el trabajo de Jung et al. se utilizaron ratones y en el trabajo de Ramanathan ratas Charles Foster, mientras que en este estudio se usaron ratas Wistar y se ha reportado que cepas de roedores genéticamente distintas muestran diferentes niveles de ansiedad en este modelo conductual [Ramos et al., 1997]. Es también importante añadir, que dado que la variabilidad experimental inherente al uso de modelos animales de ansiedad no condicionados es grande, el trabajo de Ramanathan et al. debe ser tomado con cautela, pues en él existe una mayor incertidumbre experimental que en el nuestro, debido a que la muestra de animales utilizada por ellos fue muy pequeña (n=7) en comparación con la que nosotros usamos (n=24), además de que dicho investigador utiliza indistintamente animales de ambos sexos (machos y

hembras). Otra de las explicaciones que podríamos plantear para las diferencias observadas por los otros grupos de investigación y el nuestro, radican en el protocolo del estudio y el impacto que éste tiene sobre la inducción de la sed en los animales experimentales. Por ejemplo, en el trabajo de Ramanathan et al., se utiliza una dosis de STZ de 50 mg/kg, mientras que en este estudio fue de 100 mg/kg en dos dosis consecutivas de 50 mg/kg. Aunado a esto, en el trabajo publicado por Ramanathan y col. se evaluó a los animales 3 días después de la administración de STZ, mientras que en nuestro estudio los evaluamos 10 días posteriores a dicho procedimiento. Esta diferencia metodológica puede ser de gran importancia, pues a los 10 días posteriores al tratamiento con STZ, las ratas diabéticas muestran una severa condición de sed (polidipsia), la cual no se presenta en tiempos previos (3 ó 5 días, ver en Rebolledo-Solleiro et al., 2013). A este respecto, resultados obtenidos en nuestro laboratorio arrojaron evidencias de que cuando los animales “diabéticos” son manipulados bajo nuestras condiciones experimentales, beben la misma cantidad de agua durante 10 minutos que animales que han sido restringidos del vital líquido durante 48 y 72 horas, mientras que el consumo de los animales evaluados 5 días posteriores al tratamiento con STZ es comparable con el de animales que no han sido privados de agua y, por lo tanto no presentan dicha condición polidíptica [Rebolledo-Solleiro et al., 2013].

Es importante también mencionar que las observaciones realizadas en nuestro grupo relacionadas con la sed y la conducta tipo ansiosa en el EPM mencionadas con anterioridad, concuerdan con el perfil ansiolítico observado por Mc Blane y Handley (1994) que reportan un incremento en el tiempo y número de entradas a los brazos abiertos del EPM cuando los animales son privados de agua por 24 ó 48 horas. Por lo anterior, es posible sugerir que el perfil ansiolítico observado en nuestros experimentos, podría estar relacionado con la búsqueda de agua en dichos brazos, tomando en cuenta la invisibilidad de ellos desde el interior de los brazos cerrados y el severo estado de polidipsia que presentan estos animales al momento de la prueba, como consecuencia de su hiperglucemia. La diferencia de efectos sobre la locomoción registrada en nuestros experimentos entre el laberinto (falta de efecto) y el OFT (disminución), en donde no existen barreras visuales, sugiere esta posible explicación [Rebolledo-Solleiro et al., 2013].

Tomando en cuenta los aspectos mencionados anteriormente, es posible sugerir que las ratas hiperglucémicas que presentan polidipsia, presentan un incremento en la motivación y, por tanto, un mayor “impulso” a explorar los brazos abiertos del laberinto en su búsqueda de agua, dando lugar a la generación de una conducta, que desde el punto de vista de la modulación de la ansiedad es equivocada. Así, bajo nuestras condiciones experimentales, la sed exacerbada y la falta de visibilidad producida por las paredes de los brazos cerrados del laberinto, pueden producir una falsa interpretación de la conducta del animal en este paradigma de ansiedad (EPM). Esta situación puede ser comparada con la conducta ansiosa medida en la prueba de Vogel, en la que ratas privadas de agua reciben un choque eléctrico al acercarse a tomar agua del bebedero de sus cajas por la necesidad de saciar su sed exacerbada [Vogel et al., 1971].



Una discusión más detallada acerca de cómo los aspectos metodológicos pueden afectar la interpretación de los resultados al estudiar la conducta tipo ansiosa de los animales tratados con STZ se encuentra en el trabajo publicado por Rebolledo-Solleiro et al. (2013).

La disminución de la actividad locomotora registrada en nuestros experimentos en el OFT después del tratamiento con STZ concuerda con lo publicado por Ramanathan et al. (1998) y por otros investigadores [Hilakivi et al., 1990; Thorré et al., 1997; Kamei et al., 2001] y muy probablemente refleja el ataque al estado general que presentan estos animales. Otra posible explicación puede ser que los datos de locomoción obtenidos en el OFT son más bien el reflejo del estado ansioso de los animales, pues éstos permanecen inmóviles durante una buena parte de la prueba. En apoyo a esta idea, los animales tratados con STZ al ser comparados con sus respectivos controles no muestran ningún efecto en la locomoción de los animales en el EPM, cuando este parámetro se mide como el número de entradas a los brazos abiertos y cerrados de este aparato.

#### - **INYECCIÓN INTRA-AMIGDALINA DE SCH23390 EN ANIMALES TRATADOS CON ESTREPTOZOTOCINA**

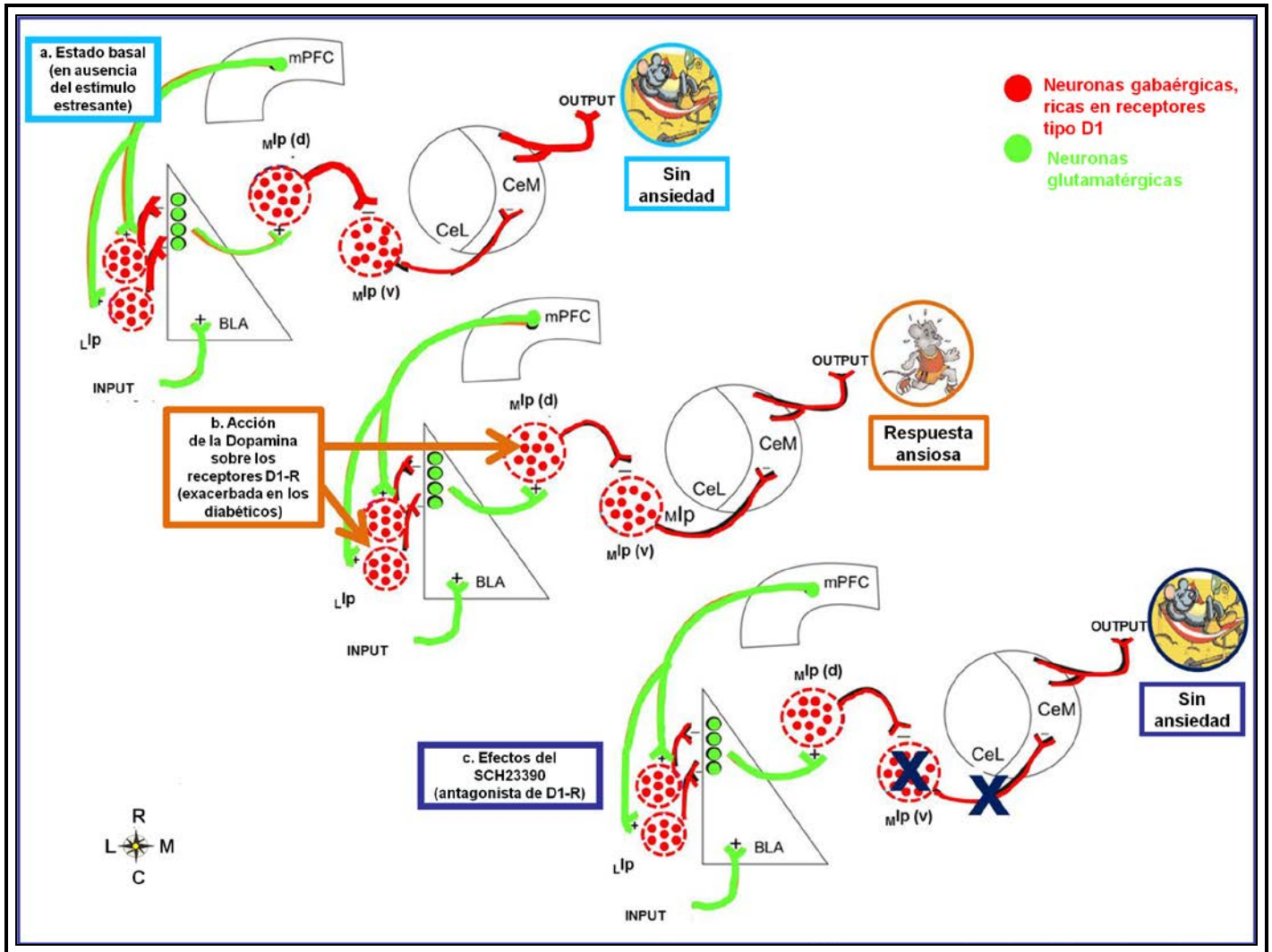
Las manipulaciones experimentales realizadas en esta parte de nuestro estudio nos permitieron observar que la inyección del SCH23390 (un antagonista selectivo de los receptores tipo D1 [Hytell et al., 1983] dentro de la amígdala de las ratas tratadas con STZ, previno de manera clara el incremento de conductas de congelamiento en la prueba de enterramiento defensivo provocadas por el tratamiento con STZ, produciendo así un efecto ansiolítico en dicho grupo de animales.

Existen evidencias que sugieren que los receptores dopaminérgicos de tipo 1 juegan un papel importante en la modulación de la ansiedad mediada por la amígdala [Pérez de la Mora et al., 2009 y 2012]. A este respecto, se han publicado trabajos donde se demuestra que la administración de agonistas y antagonistas de los receptores D1 producen efectos directos sobre la conducta ansiosa de las ratas en paradigmas condicionados y no condicionados. Por ejemplo, la inyección intra-amigdalina de SCH23390 produce efectos ansiolíticos en la caja luz-obscuridad [Pérez de la Mora et al., 2005] y en el EPM [Rezayof et al., 2009]. También se ha reportado que la microinfusión de este fármaco interfiere con el congelamiento condicionado [Guarraci et al., 1999], la conducta de sobresalto en la prueba de sobresalto potenciado por el miedo [Lamont y Kokkinidis, 1998] y bloquea, así mismo, el condicionamiento de segundo orden [Nader y LeDoux, 1999]. Por otro lado, se ha reportado que la administración de agonistas de los receptores tipo D1 dentro del complejo amigdalino produce efectos ansiogénicos. Por ejemplo, el SKF82958 induce el congelamiento condicionado [Guarraci et al., 1999], mientras que el SKF38393 produce un aumento en el tiempo total de enterramiento en la prueba de enterramiento defensivo [Pérez de la Mora et al., 2008]. Recientemente, el grupo de Liu y col. (2011) demostraron que animales “knockout” condicionados (KOc) en los que se suprimió la expresión del receptor la leptina en neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT), mostraban un perfil ansiogénico en el EPM, pero que éste efecto se revertía a través de la microinyección de SCH23390 en el núcleo central de la amígdala, apoyando la

idea de que la señalización producida por la leptina en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio está mediada por receptores de tipo D1 y que éste repercute en la función del núcleo central amigdalino, jugando así un papel crucial en la expresión de la ansiedad.

Los mecanismos por los cuales la ansiedad se incrementa en los animales tratados con STZ aún no son claros. Sin embargo, existen algunas evidencias que permiten sugerir que la condición hiperglucémica crónica presente en los diabéticos puede provocar alteraciones en el funcionamiento del sistema dopaminérgico presente en la amígdala. A este respecto, Hajnal y Lénárd (1997) demostraron con estudios de microdiálisis que la concentración de dopamina (DA) se incrementa dentro de la amígdala después de la ingesta de alimentos o de una administración periférica de glucosa, mientras que sus niveles disminuyen cuando se administra insulina exógena, que reduce la concentración sanguínea de glucosa. Aunado a estos datos, existen evidencias experimentales que sugieren que la DA, a través de la activación de sus receptores tipo D1, puede incrementar el estado ansioso de un individuo al remover del núcleo basolateral la inhibición GABAérgica que éste presenta por el efecto de las vías corticales sobre las islas intercaladas paracapsulares, las cuales son ricas en receptores tipo D1 [Marowsky et al., 2005; Pérez de la Mora et al., 2010]. Los receptores D1 también pueden producir un incremento de ansiedad al ser activados en las islas intercaladas paracapsulares mediales, las cuales mantienen inhibido al núcleo central amigdalino [Amano et al., 2011; ver también la revisión de Palomares-Castillo et al., 2012], el cual es la principal aferencia de esta región cerebral. Así, es posible sugerir que la DA liberada bajo condiciones de hiperglucemia crónica, active de manera exacerbada a los receptores tipo D1 presentes en la isla principal y/o en las islas intercaladas paracapsulares, provocando una respuesta ansiosa (ver Figura 10). La hipótesis anterior se apoya también al considerar datos en los que se ha reportado que en los animales tratados con STZ se produce un incremento en los niveles de ARNm de los receptores D1 dentro del hipocampo [Robinson et al., 2009] y la corteza cerebral [Kumar et al., 2010]. Por lo anterior, resulta tentador sugerir que podría existir además un aumento de la síntesis de estos receptores en otras regiones del sistema límbico, como la amígdala, y de esta forma facilitar la expresión de conductas ansiosas en las ratas hiperglucémicas, hipótesis que tendrá que ser confirmada más adelante.

La importancia de los resultados arrojados en nuestro estudio radican en que se abre la posibilidad de probar si el bloqueo de los receptores tipo D1 amigdalinos puede ser usado como un blanco terapéutico novedoso para el control de la ansiedad en los pacientes diabéticos, tema que puede ser un campo de futura investigación, por demás interesante.



**Figura 10. Participación de los receptores tipo D1 en el procesamiento de la conducta ansiosa en los individuos diabéticos**

a) En ausencia del estímulo estresante, las vías glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal activan las neuronas gabaérgicas de las islas intercaladas laterales (ricas en receptores tipo D1), que a su vez promueven la liberación de Glutamato en el núcleo BLA. El glutamato liberado activa las neuronas GABAérgicas mediales de la isla principal amigdalina, las cuales mantienen inhibido de manera tónica por la liberación de GABA al núcleo central amigdalino, impidiendo así la manifestación de la respuesta al miedo y la ansiedad. b) Cuando se presenta el estímulo amenazante, se libera Dopamina en la amígdala y a través de la acción en sus receptores tipo D1 en las islas paracapsulares laterales, activan la liberación de GABA (antagonizando la liberación de Glutamato) y “deshiniben” el núcleo central amigdalino, generando así la aparición de la respuesta de miedo y ansiedad. c) El SCH23390 a través del bloqueo de los receptores tipo D1 en las neuronas gabaérgicas, produce un efecto ansiolítico, regresando al individuo a su estado basal “normal”, i.e., sin ansiedad [Modificado de Pérez de la Mora et al., 2010].

## - ANIMALES SOMETIDOS A ALIMENTACIÓN HIPERCALÓRICA (SOLUCIÓN DE SACAROSA AL 20%)

En este trabajo pudimos observar adicionalmente que, como fue reportado por Velasco y col. (2012), ratas tratadas con una solución de sacarosa al 20% durante 6 meses desarrollan una serie de alteraciones fisiológicas y metabólicas, tales como el aumento en el peso corporal, obesidad abdominal, hiperglucemia, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión arterial. Todos estos datos, en conjunto dejan ver síntomas similares a los que se agrupan en el humano bajo el nombre de síndrome metabólico [Chew et al., 2006; Alberti et al., 2006; Day et al., 2007].

Bajo el escenario observado en nuestros experimentos, el principal hallazgo de este estudio fue que se obtuvieron datos que sugieren un perfil ansiogénico en ratas macho, adultas que fueron sometidas a una dieta rica en carbohidratos (solución de sacarosa al 20%) durante periodos prolongados. Estas alteraciones conductuales, entonces, se añaden a las alteraciones metabólicas que estos animales presentan. El estado ansioso de las ratas tratadas con la solución de sacarosa fue observado en dos de los tres paradigmas conductuales usados en su estudio. En el paradigma del OFT se pudo detectar una evitación en la exploración de los cuadros centrales del dispositivo, así como un incremento en la cantidad de tiempo que el animal pasa realizando conductas de congelamiento. Por otro lado, en la prueba de enterramiento defensivo, pudimos notar un incremento en el porcentaje de tiempo que el animal pasaba realizando conductas de enterramiento con alguna de sus extremidades (delanteras y traseras). Estas conductas han sido consideradas como índices de ansiedad en dichas pruebas conductuales, como ha sido reportado con anterioridad [Pérez de la Mora et al., 2012; De Boer y Koolhaas, 2003]. Es importante mencionar, que el incremento de ansiedad observado en nuestros experimentos parece ser específico, puesto que la locomoción de los animales utilizados no fue afectada, a pesar del incremento del peso corporal que estos manifestaron al momento del experimento.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los datos reportados por otros autores que utilizaron modelos de síndrome metabólico en ratones transgénicos. Tal es el caso de Yamamoto et al. (2000) y Li et al. (2002), que reportaron en ratas tipo OLETF (que presentan obesidad e hiperglucemia) un perfil ansiogénico en el EPM, la caja luz-obscuridad y la prueba de neofobia alimentaria. Además de estas observaciones, el trabajo de Harris y col. reportó también un estado tipo ansioso en el EPM y la caja obscuridad utilizando ratones transgénicos de la cepa BPAA (un modelo de obesidad y diabetes). Aunados a estos datos están los resultados de Asakawa et al. (2007) que señalaron que ratones transgénicos tipo  $Ins^{2Akita}$  (que muestran hipoinsulinemia e hiperglucemia) mostraron una reducción en el tiempo y número de entradas a los brazos abiertos del EPM y un incremento en el tiempo de congelamiento en la prueba de campo abierto.

Nuestros resultados también están de acuerdo con los datos que otros autores reportaron al someter a roedores a una dieta rica en grasas, mostrando un incremento de ansiedad en el EPM [Marks et al., 2009; Sharma

y Fulton 201, la caja luz-obscuridad, el enterramiento de canicas [Marks et al., 2009] y el OFT [Sharma y Fulton 2013].

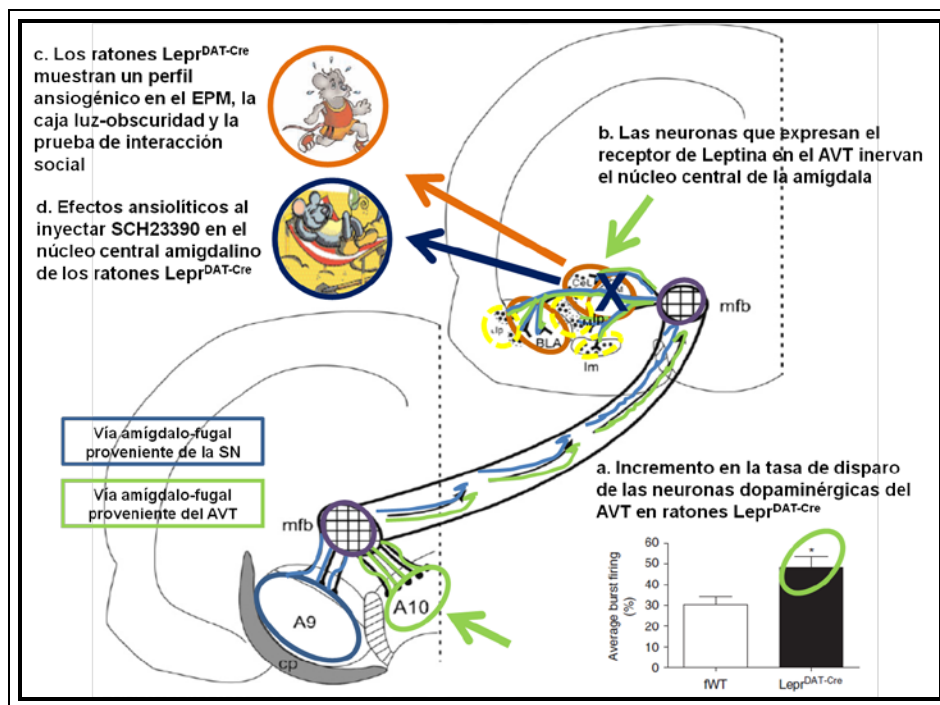
La falta de resultados estadísticamente significativos observados en el EPM en este estudio pueden deberse a un “efecto de techo” considerando que un porcentaje considerable de animales que formaban parte del grupo control no exploraron los brazos abiertos del laberinto (el 44%) en ninguna ocasión. Este hecho hace difícil la comparación entre nuestros grupos y puede interferir con la detección del perfil ansiogénico detectado en las otras pruebas conductuales realizadas. A pesar de lo anterior, el análisis cuantitativo realizado en nuestro laboratorio arroja evidencias de que los animales sometidos a la dieta hipercalórica exploran menos los brazos abiertos del laberinto y con mayor moderación que los controles, lo cual podría apoyar la noción de que los animales tratados con sacarosa muestran un incremento de ansiedad basal en nuestro estudio.

Los mecanismos involucrados en el incremento de ansiedad observado en las ratas tratadas con la solución de sacarosa son aún desconocidos. Sin embargo, la glucosilación de las proteínas a través de la formación de AGEs (Advanced Glycation End Products), que ocurre en los efectos tardíos de la diabetes, pudo haber jugado un papel en el desarrollo de la conducta tipo ansiosa. En apoyo a esta idea, pudimos observar que el perfil ansiogénico en los animales tratados con sacarosa es posible detectarlo sólo a los 6 meses de tratamiento, cuando la condición hiperglucémica se ha establecido en ellos, pero no a los 2 y 3 meses (datos no mostrados), donde aún no hay ningún aumento significativo de los niveles de glucosa plasmática.

Por otro lado, los niveles plasmáticos de leptina -una hormona derivada del tejido adiposo y codificada por el gen *ob-*, aumentaron debido al tratamiento con la solución de sacarosa, como se indicó anteriormente. Dado que los ratones deficientes del gen de la leptina (*ob/ob*) exhiben un fenotipo ansioso [Finger et al., 2010] y que la administración de leptina exógena produce efectos ansiolíticos en ratones silvestres [Liu et al., 2010] y atenúa la ansiedad observada en los ratones *ob/ob* [Asakawa et al., 2003], es posible que un estado de resistencia a la leptina pudiera estar involucrado en el incremento de ansiedad observado en los animales de nuestro estudio. En apoyo a esta idea, se ha reportado que personas que sufren de estrés post-traumático persistente presentan niveles elevados de leptina plasmática [Liao et al., 2004]. Además, existen estudios que arrojan evidencia de que ratas que se hicieron obesas por efecto de la dieta muestran un estado de resistencia a la leptina tanto en el hipotálamo [Widdowson et al., 1997; Levin y Dunn-Meynell, 2006; Zhang y Scarpace, 2006], como en el área ventral tegmental (AVT) [Matheney et al., 2011; Scarpace et al., 2013]. Esta alteración puede ocurrir a consecuencia de una disminución en la expresión del receptor de la leptina y/o de una reducción en su capacidad para activar las señales de transducción generadas por el mismo [Zhang y Scarpace 2006], o de una reducción en el transportador de leptina hacia el líquido cerebro espinal [Caro et al., 1996].

Como se ha mencionado en la introducción de este trabajo, es bien aceptado que la amígdala juega un rol esencial en la modulación de la ansiedad y que existen evidencias de que los receptores dopaminérgicos

modulan este fenómeno de forma fina. Dado que las neuronas del AVT son el origen de las vías dopaminérgicas que inervan a la amígdala [Dahlström y Fuxe 1964; Fuxe et al., 1965; Pérez de la Mora et al., 2010], y que se ha reportado que los ratones carentes del receptor de leptina en esta región cerebral manifiestan un incremento de la tasa de disparo dopaminérgica [Liu et al., 2011], es posible que la resistencia a la leptina dentro del AVT puede haber provocado el incremento de ansiedad observado en nuestros experimentos (Ver Fig. 11). Además, es posible que estos efectos ansiogénicos puedan estar mediados por la actividad de los receptores tipo D1, puesto que la administración intra-amigdalina del SCH23390, atenúa la ansiedad observada en los ratones KO  $Lepr^{dat-Cre}$  [Liu et al., 2011] e induce efectos ansiolíticos en ratas evaluadas en la caja luz-obscuridad, [Pérez de la Mora et al., 2005] y el EPM [Bananej et al., 2011]. El estado de resistencia a la leptina que se sugiere está presente en nuestros animales experimentales pudo haberse generado adicionalmente por la ingestión de la solución de sacarosa con la que dichos animales fueron alimentados, puesto que la digestión y absorción intestinal de este azúcar deriva en la producción de fructosa y se ha reportado que este azúcar puede provocar un estado de resistencia a la leptina [Scarpace y Zhang, 2009].



**Figura 11. Esquema representativo del trabajo de Liu et al., 2010.**

En este esquema se observa que los ratones  $Lepr^{DAT-Cre}$  que carecen del receptor de leptina en las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (AVT) muestran un incremento en la tasa de disparo en esta región cerebral y con ello muy probablemente aumenta también la actividad dopaminérgica de la amígdala. El trabajo de Liu et al. arrojó evidencias de que los ratones  $Lepr^{DAT-Cre}$  muestran un perfil ansiogénico en el EPM, la caja luz-obscuridad y la prueba de interacción social. Este efecto se revierte inyectando el SCH23390 en el núcleo central amigdalino, obteniendo efectos ansiolíticos en estos animales. Nuestras observaciones en el modelo de ratas tratadas con sacarosa sugieren que un efecto parecido puede ocurrir en nuestros animales del grupo experimental, tomando en cuenta que éstos son hiperleptinémicos y, muy seguramente, muestran también una resistencia a la acción central de la leptina.

Por otro lado, la resistina, otra hormona derivada del tejido adiposo, también se encontró aumentada en los animales tratados con sacarosa, como ha sido reportado por otros autores [Steppan et al., 2001; Dewaga-Yamauchi et al., 2003; Owecki et al., 2011; Sadashiv-Tiwari et al., 2012]. Dado que estudios recientes sugieren que la resistina puede estar relacionada con procesos depresivos [Lehto et al., 2010] y la comorbilidad depresión-ansiedad es común en el ámbito clínico, es tentador sugerir que el incremento de los niveles de resistina pudieran haber contribuido al establecimiento de las conductas tipo ansiosas observadas en nuestros experimentos. Es evidente que se requieren estudios en torno a este tema para aclarar el impacto de la resistina sobre los niveles de ansiedad en los roedores.

En este estudio también se muestran evidencias de que los animales tratados con la solución de sacarosa por 6 meses incrementaron de forma significativa la cantidad de grasa alojada en la región abdominal y con ello, la dimensión de la circunferencia de esta región. Es bien conocido que la grasa abdominal es una fuente de moléculas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  [Ronti et al., 2006; Hryorczu et al., 2013] y que la circunferencia abdominal está relacionada con la aparición de desórdenes ansioso-depresivos en el humano [Takeuchi et al., 2009; Luppino et al., 2011]. También ha sido reportado experimentalmente que la administración intracerebroventricular de IL- $\beta$  y TNF- $\alpha$  produce conductas tipo ansiosas en el EPM [Connor et al., 1998] y que el perfil ansiogénico observado en este paradigma conductual está relacionado con el incremento en la expresión de los niveles de ARNm de IL-2 en la corteza prefrontal y en el estriado [Pawlak, et al., 2003 y 2005]. Estos datos nos permiten sugerir que, probablemente, las moléculas proinflamatorias liberadas por la grasa abdominal en nuestros animales pudiera haber tenido un efecto sobre la conducta de los animales estudiados en este trabajo. Es evidente, que se requiere investigar con mayor profundidad si estas moléculas se encuentran elevadas en los animales experimentales y si éstas tienen un rol en la ansiedad observada en los mismos; sin embargo es un campo de investigación que puede ser muy interesante también.

Finalmente, la posibilidad de que el aumento de ansiedad observado en los animales obesos y “diabéticos” pudiera deberse a la hipertensión que éstos presentan, y que ha sido reportado producen un patrón conducta en el EPM similar al observado en nuestros experimentos [Golda et al., 1990; Wilson et al., 1996; Krsková et al., 2007] es poco probable, debido a que la hipertensión se presenta en estas ratas desde los 2 meses de haber iniciado el tratamiento, efecto que no coincide con la presencia de las alteraciones en los niveles de ansiedad observado en nuestras ratas (datos no publicados).

En conclusión, los resultados obtenidos en esta parte del estudio apoyan la noción de que el tratamiento crónico con una solución de sacarosa provoca una condición parecida al síndrome metabólico y que existe una relación estrecha con la aparición de la conducta tipo ansiosa y esta entidad patológica. Estudios futuros deberán estar enfocados a estudiar los mecanismos que subyacen a esta relación.

### CONCLUSIONES

Las observaciones obtenidas en este estudio utilizando el OFT y el enterramiento defensivo nos permiten concluir, como ha sido sugerido por otros autores, que tanto en la DM, como en el de SM, existe una estrecha relación con la ansiedad y que esta se correlaciona con la severidad de la hiperglucemia y el estado físico del animal. Así, mientras que las conductas activas (huida hacia la periferia del OFT y aumento de la conducta de enterramiento en la prueba del enterramiento defensivo) predominaron en las ratas obesas, -que muestran menores niveles de glucosa sanguínea (tratadas con sacarosa:  $240 \pm 21$  vs tratadas con estreptozotocina:  $530 \pm 14$  mg/dl) y se encuentran menos deterioradas físicamente que las las tratadas con estreptozotocina-, las conductas pasivas (congelamiento) predominaron en los animales tratados con estreptozotocina.

Aunque se requiere realizar investigaciones posteriores para conocer la naturaleza de los mecanismos que subyacen a la relación diabetes y/o síndrome metabólico y ansiedad, nuestros resultados sugieren que mecanismos dopaminérgicos alterados (v.g. un estado hiperdopaminérgico) en la amígdala, pudieran ser la causa o al menos participar en la ansiedad y abren la la posibilidad de que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 pudiera ser usado como una alternativa terapéutica novedosa para el control del incremento de ansiedad de los pacientes diabéticos y/o con síndrome metabólico.

Finalmente, nuestros resultados indican que a pesar de su popularidad en la literatura, el laberinto elevado en forma de "+" no es una herramienta de estudio adecuada para determinar el estado ansiogénico de los animales "diabéticos" y/o con síndrome metabólico, u otras condiciones que cursen con una acentuada polidipsia.

### PERSPECTIVAS

#### - Animales tratados con estreptozotocina

Profundizar en los mecanismos dopaminérgicos intra-amigdalinos que pudieran estar involucrados en el incremento de ansiedad observado en estos animales:

- Realizar ensayos de autorradiografía y/o inmunohistoquímica para conocer el grado de expresión de los receptores tipo D1 en las islas intercaladas de la amígdala y otras regiones ricas en este tipo de receptores.
- Diseñar antagonistas para el receptor dopaminérgico D1 con actividad después de su administración oral y estudiar sus posibles efectos en la ansiedad de animales diabéticos o con síndrome metabólico.



- **Animales sometidos a dieta hipercalórica (solución de sacarosa al 20%) durante 6 meses**

Indagar los mecanismos que pudieran estar relacionados con el incremento de ansiedad observado en estos animales:

- a. Investigar si el sistema dopaminérgico está relacionado con el incremento de ansiedad a través de:
  - Realizar ensayos farmacológicos utilizando la inyección sistémica de SCH23390 para conocer si participan o no los receptores tipo D1 en el incremento de ansiedad observado en animales sujetos a una dieta hipercalórica.
  - Realizar ensayos de autorradiografía y/o inmunohistoquímica para conocer el estado de expresión de los receptores tipo D1 en las islas intercaladas amigdalinas y en otras regiones primordialmente dopaminérgicas del cerebro, como el área ventral tegmental, el núcleo accumbens y el estriado y estudiar si estos pudieran estar relacionados con el incremento de ansiedad en estos animales.
- b. Investigar si existe o no un incremento en citosinas pro-inflamatorias y si éstas están relacionadas con el incremento de ansiedad observado:
  - Cuantificar los niveles plasmáticos de citosinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2)
  - Realizar ensayos farmacológicos utilizando antagonistas de los receptores de dichas moléculas administrados de forma sistémica, para ver si se atenúan los niveles de ansiedad en estos animales
  - Examinar mediante qRT-PCR si los niveles de RNAm de las citosinas proinflamatorias se encuentra alterado en distintas regiones del sistema límbico, para ver si éstos pudieran estar relacionada con el incremento de ansiedad observado.
- c. Investigar si las adipocinas (leptina y/o resistina) están relacionadas con el incremento de ansiedad observado:
  - Realizar ensayos farmacológicos utilizando antagonistas los receptores de leptina (ob-R) administrados de forma sistémica para ver si se atenúan los niveles de ansiedad en estos animales
  - Examinar mediante qRT-PCR si los niveles de RNAm de resistina se encuentra alterado en distintas regiones del sistema límbico, para ver si éstos pudieran estar relacionada con el incremento de ansiedad observado

## 7. REFERENCIAS

- Abraham PM, Kuruvilla KP, Mathew J, Malat A, Joy S, Paulose CS. 2010. Alteration in hippocampal serotonergic and INSR function in streptozotocin induced diabetic rats exposed to stress: neuroprotective role of pyridoxine and *Aegle marmelose*. J Biomed Sci 25:78.
- Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gómez-Pérez FJ, Valles V, Ríos-Torres JM, Franco A, Olaiz G, Rull JA, Sepúlveda J. 2004. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. Arch Med Res. 35:76-81.
- Akasawa A, Inui A, Inui T, Katsuura G, Fujino M, Kasuga. 2003. Leptin treatment ameliorates anxiety in *ob/ob* obese mice. J Diabetes Complications 17:105-107.
- Akasawa A, Toyoshima M, Inoue K, Koizumi A. 2007. *Ins2<sup>Akita</sup>* mice exhibit hyperphagia and anxiety behavior via the melacortin system. Int J Mol Med 19:649-652.
- Aksu I, Ates M, Baykara B, Kiray M, Sisman AR, Buyuk E, Baykara B, Cetinkaya C, Gumus H, Uysal N. 2012. Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. Neurosci Lett. 531:176-81.
- Albert U, Aguglia A, Chiarle A, Bogetto F, Maina G. 2013. Metabolic syndrome and obsessive-compulsive disorder: a naturalistic Italian study. Gen Hosp Psychiatry 35:154-159.
- Alberti KG, Zimmer P, Shaw J. 2006. Metabolic syndrome- a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. Diab Med 23: 469-480.
- Alcántara-González D. 2008. Efectos de la Dopamina en las crisis generalizadas inducidas por el kindling eléctrico hipocampal en rata. Maestría en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental. CINVESTAV Sede Sur-IPN. 100 p.p.
- Amano T, Duvarci S, Popa D, Paré D. 2011. The fear circuit revisited: contributions of the basal amígdala nuclei to conditioned fear. J Neurosci 31: 15481-15489.
- Anderson RJ, Grisby A, Freedland KE, de Groot M, McGill JB, Clouse RE. 2002. Anxiety and poor glycemic control: A meta-analytic review of the literature. Int J Psychiatry Med 32: 235-247.
- Arredondo A, Zúñiga A. 2004. Economic consequences of epidemiological changes in Diabetes in middle-income countries. The Mexican case. Diabetes Care 27: 104-109.
- Ates M, Dayi A, Sisman AR, Agilkaya S, Aksu I, Baykara B, Buyuk E, Cetinkaya C, Cingoz S, Uysal N. 2014. Anxiety- and depression-like behavior are correlated with leptin receptor expression in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. Biotech Histochem 5:1-11.
- Aydin S, Aksoy A, Aydin S, Kalayci M, Yilmaz M, Kuloglu T, Citil C, Catak Z. 2014. Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. Nutrition 30:1-9.
- Bananej M, Karimi-Sori A, zarrindast MR, Ahmadi S. 2011. D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. J Psychopharmacol 26:564-574.

- Banks WA, Owen JB, Erickson MA. 2012. Insulin in the brain: there and back again. *Pharmacol Ther* 136:82-93.
- Barber M, Kasturi BS; Austin ME; Patel KP, MOhanKumar SM, Mohan Kumar PS. 2003. Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Re.* 21:964:128-135.
- 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* 269:1115-1118.
- Bellush LL, Reid SG, North D. 1991. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. 1991. *Physiol Behav* 50:973-981.
- Bellush LL and Reid SG. 1994. Metabolic and neurochemical profiles in insulin-treated diabetic rats. *Am J Physiol* 266:87-94.
- Beltrán-Sánchez H, Harhay MO, Harhay MM, McElligott S. 2013. Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010. *J Am Coll Cardiol* 62:697-703.
- Belzung C y Greibel G. 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behavior in mice: a review. *Behav Brain Res* 125:141-149.
- Bienenkapp JC and Rudy JW. 2008. Hippocampal and extrahippocampal systems compete for control of contextual fear: role of ventral subiculum and amígdala. *Learn Mem* 16:38-45.
- Borowski TB, Kokkinidis L. 1996. Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditional fear: effects of electrical stimulation, excitotoxin lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. *Behav. Neurosci* 110:1349-1364.
- Bowman V, Adriaanse MC, van 't Riet E, Snoek FJ, Dekker JM, Nijpels G. 2010. Depression, anxiety and glucose metabolism in the general Dutch population: The New Hoorn Study. *PLoS ONE* 5: e9971.
- Can OD, Oztürk Y, Ozkay UD. 2011. Effects of insulin and St. John's Wort treatments on anxiety, locomotory activity, depression, and active learning parameters of streptozotocin-diabetic rats. *Planta Med.* 77:1970-1976.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhand PL, Sinha MK, Considine RV. 1996. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ration in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348:159-161.
- Carola V, DÓlimpio F, Brunamonti E, Mangia F, RENzi P. 2002. Evaluation of the elevated-plus maze and open-field tests for the assesment of anxiety-related behavior in inbred mice. *Behav Brain Res* 134:49-57.
- Carroll D, Phillips AC, Thomas GN, Gale CR, Deary I, Batty GD. 2009. Generalized anxiety disorder is associated with metabolic syndrome in the Vietnam experience study. *Biol Psychiatry* 66:91-93.
- Cefalu WT, 2006. Animal modelos of type 2 diabetes: Clinical presentation and pathophysiology relevance to the huma condition. *ILAR J* 47:186-198.
- Chan O, Chan S, Inouye K, Vranic M, Matthews SG. 2001. Molecular Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology* 142: 4872-4879.

- Chan O, Chan S. 2002. Diabetes impairs hypothalamo-Pituitary-adrenal (HPA) responses to hypoglycemia and insulin treatment normalizes HPA but not Epinephrine responses. *Diabetes* 51: 1681-1689.
- Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. 2009. The use of animal models in the study of Diabetes Mellitus. *In vivo* 23:245-258.
- Chauloff F, 1994. Failure to find behavioral differences between lean and obese Zucker rats exposed to novel environments. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18:780-782.
- Chew GT, Gan SK, Watts GF. 2006. Revisiting the Metabolic Syndrome. *Med J Aust* 185: 445-449.
- Clavijo M, Carvalho JJ, Rios M, Ries de Oliveira I. 2006. Trastornos psiquiátricos en pacientes diabéticos tipo 2 en el distrito de Rio Branco, Acre. *Arq Neuropsiquiatr* 64:807- 813.
- Coker, A O; Ohaeri, J U; Lawal, R A; Orija, O B. 2000. Specific psychiatric morbidity among diabetics at a Nigerian General Hospital. *East Afr Med j* 77:42-45.
- Comin D Gazarini L, Nielis Zanon J, Milani H, Weffort de Oliveira RM. 2010. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. *Behav Brain Res* 210:38-45.
- Connor TJ, Song C, Leonard BE, Merali Z, Anisman H. 1998. An assessment of central interleukin-1 beta, -2 , -6 and tumor necrosis factor- alpha administration on some behavioral, neurochemical endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience* 84:923-933.
- Dahlström A, Fuxe K. 1964. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I: Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 62: 1-55.
- Damsa C, Kosel M, Moussally J. 2009. Current status of brain imaging in anxiety disorders. *Curr Opin Psychiatry* 22:96-110.
- Davidson RJ e Irwin W. 1999. The functional neuroanatomy of emotion and affective style. *Trends Cogn Sci* 3:11-21.
- Day C. 2007. Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 4:32-38.
- De Boer SF and Koolhaas JM. 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and Psychopharmacol. *Eur J Pharmacol* 463:145-161.
- Dewaga-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, et al. 2003. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5452-5455.
- Echavarría-Pinto M, Hernández-Lomelí A, Alcocer-Gamba MA, Morales-Flores H, Vázquez-Mellado A. 2006. Metabolic syndrome in adults from 20 to 40 years old in a rural Mexican community. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 44:329-335.
- Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciocchi S, Herrey C, Luthi A. 2009. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62:757-771.
- Eren I, Erdi O, Ozcankaya R. 2003. Relationship between blood glucose control and psychiatric disorders in type II diabetic patients. *Turk Psikiyatri Derg* 14:184-191.

- Feldman S and Weidenfeld J. 1998. The excitatory effects of the amygdala on hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses mediated by hypothalamic norepinephrine, serotonin and CRF-41. *Brain Res Bull* 45:389-393.
- Fernández-Guasti A, Ferreira A, Picazo O. 2001. Diazepam but not buspirone, induces similar anxiolytic-like effects in lactating and ovariectomized Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70:85-93.
- Figlewics DP, Brot MD, McCall AL, Szot P., 1996. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res* 736: 54-60.
- Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. 2010. Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviors. *Psychopharmacol* 210:559-568.
- Flores Gracia, CP. 2005. Receptores GABAa de la amígdala de mamíferos: su función en la modulación de la ansiedad. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.
- Fuxe K. 1965. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand Suppl.* 64:39-85.
- 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* 119:733-746.
- Gallegos-Cari A; de la Mora MP; Arizmendi-García Y; et al. 2010. Participación de los receptores Dopaminérgicos D2 de la amígdala en la modulación del miedo y la ansiedad. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Psicología.
- Garabadu D and Kishnamurthy, 2014. Diazepam potentiates the antidiabetic, antistress and anxiolytic activities of metformin in Type-2 Diabetes Mellitus with cooccurring stress in experimental animals. *Biomed Res Int* 2014:6943074.
- Ghasemi R, Haeri A, Dargahi L, Mohamed Z, Ahmadiani A. 2013. Insulin in the brain: sources, localization and functions. *Mol Neurobiol* 47:145-171.
- Golda V, Petr P. 1990. Animal model of anxiety: the effect of methyl dopa in the genetically hypertensive non-obese rats of Koletsky type in the rats of Wistar strain. *Sb Ved Pr Lek Fak Karbvy Univerzity Hradci Kralove* 33:529-537.
- Greba Q and Kokkinidis L. 2000. Peripheral and intra-amygdalar administration of the dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 blocks fear-potentiated startle but not shock reactivity or the shock sensitization of acoustic startle. *Behav. Neurosci* 114:262-272.
- Grisby AB, Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. 2002. Prevalence of anxiety in adults with diabetes. A systematic review. *J Psychosom Res* 53:1053-1060.
- Guarraci FA, Frohardt RJ, Kapp BS. 1999a. Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res* 827:28-40.
- Guarraci FA, Frohardt RJ, Young FL, Kapp BS. 1999b. A functional role for dopamine transmission in the amygdala during conditioned fear. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 877:732-736.

- Guarraci FA, Frohardt RJ, Falls WA, Kapp BS. 2000. The effects of intra-amygdaloid infusion of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* 114:647- 651.
- Hajnal A and Lénárd I. 1997. Feeding-related dopamine in the amygdale of freely moving rats. *Neuroreport* 8:2817-2820.
- Hamann S, Herman RA, Nolan CL, Wallen K. 2004. Men and women differ in amygdale response to visual sexual stimuli. *Nat Neurosci* 7:411-415.
- Harris, RBS; Zhou, J; Shi, M; Redmann, S; Mynatt, RL; Ryan, DH. 2001. Overexpression of agouti protein and stress responsiveness in mice. *Physiol Behav* 73: 599-608.
- Heinze G. 2003. La ansiedad: cómo se la concibe actualmente. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias.* 54:8-15.
- Henninger F, Ohl P, Holter O, Weißenbacher P, Toschi N, Lorsch N, 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. *Behav. Brain Res.* 111:153-163.
- Hernández-Gómez AM, Aguilar-Roblero R, Pérez de la Mora M. 2002. Role of cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptors in anxiety. *Amino Acids* 23: 283-90.
- Herzer M and Hood KK. 2010. Anxiety symptoms in adolescents with type 1 diabetes: association with blood glucose monitoring and glycemic control. *J Pediatr Psychol* 35:415-425.
- Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. 1990. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in test of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol behav* 48: 429-433.
- Hildrum B, Mykletun A, Midthjell K, Ismail K, Dahl AA. 2009. No association of depression and anxiety with the metabolic syndrome: the Norwegian HUNT study. *Acta Psychiatr Scand* 120:14-22.
- Ho N, Balu DT, Hilario M, Blendy JA, Lucki I. 2012. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol and Behav* 105:702-708.
- Hryorczuk C, Sharma S, Fulton SE. 2013. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Nerurosci* 7:177.
- Huang Q, Timofeeva E, Richard D. 2006. Corticotropin-releasing factor and its receptors in the brain of rats with insulin and corticosterone deficits. *J Mol. Endocrinol* 32:213-226.
- Husain GM, Chatterjee SS, Singh PN, Kumar V. 2011. Beneficial effect of *Hypericum perforatum* on depression and anxiety in a type 2 diabetic rat model. *Acta Pol Pharm.* 2011 Nov-Dec;68(6):913-8.
- Hytell J. 1983. SCH23390-the first selective dopamine D-1 antagonist. *Eur J Pharmacol* 91:153-154.
- Jöhren O, Gremmels JA, Qadri F, Dendorfer A, Dominiak P. 2006. Adrenal expression of orexin receptor subtypes is differentially regulated in streptozotocin induced type 1 diabetes. *Peptides* 27:2764-2769.
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher, Renold AE. 1969. Diabetogenic Action of Streptozotocin: Relationship of Dose to Metabolic Response. *J Clin Invest* 48:2129-2139.

- Jung SW, Han OK, Kim SJ. 2010. Increased expression of b amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction. *J Neural Transm* 117:1411-1418.
- Kaidanovich-Beilin O, Cha DS, McInntyre RS. 2012. Crosstalk between metabolic and neuropsychiatric disorders. *F1000 Biol Rep* 4:1-14.
- Kamei J, Ahsawa M, Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. 2001. Modification of the effects of benzodiazepines on the exploratory behaviours of mice on a hole-board by diabetes. *Jpn J Pharmacol* 86: 47-54.
- Kamei J, Miyata S, Morita K, Saitoh A, Takeda H. 2003. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on immobility time in the tail suspension test in streptozotocin-induced diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav* 75:247-254.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2001. Principles of neural science. MacGraw Hill Health Professions Division. EUA. 1414 pp.
- Khanam, R; Pillai, KK. 2007. Effect of chronic chromium picolinate in animal models of anxiety and memory. *Fundam Clin Pharmacol* 21: 531-534.
- Kluver H, Bucy PC. 1939. Preliminary analysis of functions of the temporal lobe in monkeys. *Arch of Neurol and Psychiatry* 42:979-1000.
- Koenigs M, Raymond ED, Cheon V, Solomon B, et al. 2007. Focal brain damage protects against post-traumatic stress disorder in combat veterans. *Nat Neurosci* 11:232-237.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H, de Jong IC, Ruis MAW, Blockhuis HJ. 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23:925-935.
- Kovacs P and Hajnal A. 2009. In vivo electrophysiological effects of insulin in the rat brain. *Neuropeptides* 43:283-293.
- Kröner S, Rosenkranz JA, Grace AA, Barrionuevo C. 2005. Dopamine modulates excitability of basolateral amygdala neurons in vitro. *J Neurophysiol* 93:1598-1610.
- Kruse, J, Schmitz N, Thefeld W. 2003. On the association between diabetes and mental disorders in a community sample: results from the German National Health Interview and Examination Survey. *Diabetes Care* 26:1841-1846
- Krsková L, Vrabcová M, Zeman M, 2007. Effect of melatonin on exploration and anxiety in normotensive and hypertensive rats with high activity of renin-angiotensin system. *Neuro Endocrinol Lett.* 28:295-301.
- Kuhad A and Chopra K. 2007. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol* 576:34-42.
- Kuhad A and Chopra K. 2008. Effect of sesamol on diabetes-associated cognitive decline in rats. *Exp Brain Res* 185:411-420.

- Kumar TP, Antony S, Gireesh G, George N, Paulose CS. 2010. Curcumin modulates dopaminergic receptor, CREB and phospholipase C gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. *J Biomed Sci* 31:43.
- Kumagai AK, 1999. Glucose transport in brain and retina: Implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 261-273.
- LaBar KS, LeDoux JE, Spencer DD, Phelps EA. 1995. Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci* 15: 6846-6855.
- Lackovic Z, Salkovic M, Kuci Z, Relja M. 1990. Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J Neurochem* 54:143-147.
- Lamont EW and Kokkinidis L. 1998. Infusion of the dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 into the amygdale blocks fear expression in a potentiated startle paradigm. *Brain Res* 795:128-136.
- Larqué C, Velasco M, Navarro-Flaveros V, Duhne M, Aguirre J, Gutiérrez-Reyes G, Moreno J, Robles-Díaz G, Hong E, Hiriart M. 2011. Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models. *IUBMB Life* 63:831-839.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chéry N, et al. 2002. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111:219-230.
- Le Doux JE. 1996. *The emotional brain. The mysterious underpinnings of emotional life.* New York: Simon & Schuster Paperback.
- Le Doux JE. 1998. Fear and the brain: Where have we been, and where are we going?. *Soc Biol Psychiatry* 44:1229-1238.
- LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- Lehto SM, Huotari A, Niskanen L, Tolmunen T, et al. 2010. Serum adiponectin and resistin levels in major depressive disorder. *Acta Psychiatr Scand* 121:209-215.
- Lemus-Castellanos AE. 2010. Relación de la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) en la inducción de conductas tipo depresivas en ratones diabéticos por estreptozotocina (STZ). *Maestría en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental. CINVESTAV Sede Sur-IPN.*
- Levin BE and Dunn-Meynell AA. 2002. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R941-R948.
- Li XL, Aou S, Hori T, Oomura Y. 2002. Spatial memory deficit and emotional abnormality in OLETF rats. *Physiol Behav* 75:15-23.
- Liao SC, Lee MB, Lee YJ, Huang TS. 2004. Hyperleptinemia in subjects with persistent partial posttraumatic stress disorder after a major earthquake. *Psychosom Med* 66:23-28. NO
- Lim DK, Lee KM, Ho IK. 1994. Changes in the central dopaminergic systems in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharm Res* 17:398-404.
- Lin EH, Korff MV, Alonso J, Angermeyer MC, et al. 2008. Mental disorders among persons with diabetes-results from the World Mental health Surveys. *J Psychosom Res* 65: 571-580.



- Linnville S, Hoyt RE, Moore JL, Segovia F, Hain RE. 2011. Posttraumatic stress disorder and metabolic syndrome: retrospective study of repatriated prisoners of war. *Mil Med* 176: 369-374.
- Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu XY. 2010. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. *Psychopharmacol* 207:535-545.
- Liu J, Pérez SM, Zhang W, Lodge DJ, Lu XY. 2011. Selective deletion of the leptin receptor in dopamine neurons produces ansiogenic-like behaviour and increases dopaminergic activity in amygdale. *Mol Psychiatry* 16:1024-1038.
- Lloyd C E, Dyer P H, Barnett A H. 2000. Prevalence of symptoms of depression and anxiety in a diabetes clinic population. *Diabet Med* 17:198-202.
- Lloyd CE, Zgibor J, Wilson RR, Barnett AH, et al. 2003. Cross-cultural comparisons of anxiety and depression in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 19:401-407.
- Ludman E, Katon W, Russo J, Simon G, et al. 2006. Panic episodes among patients with diabetes. *Gen Hosp Psychiatry* 28:475-481.
- Luppino FS, van Reedt Dortland AK, Wardenaar KJ, Bouvy PF, et al. 2011. Symptom dimensions of depression and anxiety and the metabolic syndrome. *Psychosom Med* 73:257-264.
- Lustman PJ. 1988. Anxiety disorders in adults with diabetes mellitus. *Psychiatr Clin North Am* 11:419-432.
- Marks DR, Tucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA. 2009. Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety and olfactory behaviors. *J Neurosci* 29:6734-6751.
- Marowsky A, Yanagawa Y, Obata K, Vogt KE. 2005. A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron* 48:1025-1037.
- Martín-Cordero L, García JJ, Ortega E. 2013. Noradrenaline-mediated inhibition of inflammatory cytokines is altered in macrophages from obese Zucker rats: Effect of habitual exercise. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 13:234-239.
- Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M, Manteghetti M, Hillaire-Buys D, et al., 1998. Experimental niddm: Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes* 47:224-227.
- Matheney M, Shapiro A, Tümer N, Scarpacci PJ. 2011. Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. *Neuropharmacology* 60:480-487.
- Mc Blane JW and Handley SL. 1994. Effects of two stressors on behavior in the elevated X-maze: Preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. *Psychopharmacol* 116: 173-182.
- McClure EB, Monk CS, Nelson EE, Zarah E, Leibenluft E et al. 2004. A developmental examination of gender differences in brain engagement during evaluation of threat. *Biol Psychiatry* 55:1047-1055.
- McDonald AJ. 2003 Is there an amygdala and how far does it extend? An Anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci* 985:1-21.
- Miyata S, Hirano S, Kamei J. 2005. Abnormal benzodiazepine receptor function in the depressive-like behavior of diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav* 82:615- 620.

- MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2004. Nov 26, 53(46):1089-92. Serious psychological distress among persons with diabetes-New York City, 2003.
- Moussa, M A; Alsaeid, M; Abdella, N; Refai, T M K; et al. 2005. Social and psychological characteristics of Kuwaiti children and adolescents with type 1 diabetes. *Soc sci med* 60:1835-1844.
- Munro LJ and Kokkinidis L. 1997. Infusion of quinpirole and muscimol into the ventral tegmental area inhibits fear-potentiated startle: implications for the role of dopamine in fear expression. *Brain Res* 746:231-238.
- Nader K, LeDoux JE. 1999. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav Neurosci* 113:891- 901.
- Nishimura T, Kubosaki A, Ito Y, Notkins L. 2009. Disturbances in the secretion of neurotransmitters in IA-2/IA-2 $\beta$  null mice: changes in behavior, learning and lifespan. *Neuroscience* 159:427-437.
- Nuche-Bricaire, AJ. 2008. Estudio conductual en torno al posible papel de los receptores GABA<sub>c</sub> amigdalinos en la modulación de la ansiedad de la rata. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Psicología.
- Ohtani N, Ohta M, Sugano T. 1997. Microdialysis study of modification of hypothalamic neurotransmitters in streptozotocin-diabetic rats. *J Neurochem* 69:1622-1628.
- Owecki M, Miczke A, Nikisch E, Pupek-Musialik D, Sowinski J. 2011. Serum resistin concentrations are higher in human obesity but independent from insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 119:117-121.
- Palomares-Castillo E, Hernández-Pérez O, Pérez-Carrera D, Crespo-Ramírez M, et al. 2012. The intercalated paracapsular islands as a module for integration of signals regulating anxiety in the amygdala. *Brain Res* 1476:211-234.
- Paré D, Quirk G, Le Doux JE. 2004. New vistas on amygdala network in conditioned fear. *J Neurophysiol* 92:1-9.
- Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RK, Bauhofer A. 2003. Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behavior in the rat. *Neurosci Lett* 341:205-208.
- Pawlak CR, Schwarting RK, Bauhofer A. 2005. Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. *Brain Res Mol Brain Res.* 137:159-165.
- Paxinos G and Watson C. 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, London.
- 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. *J Neurosci Meth* 14:149-167.
- Pérez de la Mora M. 2003. La ansiedad, un fenómeno de nuestro tiempo. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias* 54:4-66.
- Pérez de la Mora M, Cárdenas-Cachón L, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, et al. 2005. Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. *Neurosci Lett* 377:101-105.
- Pérez de la Mora M; Flores Gracia CP, Crespo Ramírez M, Hernández Gómez AM, y Lara García DA. 2007. La amígdala, una estructura anatómica con relevancia para la ansiedad. En DeCelis R (Ed.). *Investigación en neurociencias, Homenaje al Dr. Alfredo Feria Velasco*. Guadalajara, México, Ed. BiomsMedica. p.p.165-179.
- Pérez de la Mora M, Jacobsen KW, Crespo-Ramírez M, Flores-Gracia CP, Fuxe K. 2008. Wiring and volumetric transmission in rat amygdala. Implications for fear and anxiety. *Neurochem Res* 33:1618-1633.

- 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. *Prog Neurobiol* 90:198-216.
- Pérez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramírez M, Marcellino D, et al. 2012. Distribution of Dopamine D2-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. *Neuroscience* 201:252-266.
- Petty F, Kramer GL, Fulton M, Moeller FG, Rush AJ. 1993. Low plasma GABA is a trait-like marker for bipolar illness. *Neuropsychopharmacology* 9:125-133.
- Petty F, Kramer GL, Gullion CM, Rush AJ. 1995. Stability of plasma GABA at four-year follow-up in patients with primary unipolar depression. Low plasma gamma-aminobutyric acid levels in male patients with depression. *Biol Psychiatry* 37: 806-810.
- Pinard CR, Muller JF, Mascagni F, McDonald AJ. 2008. Dopaminergic innervations of interneurons of the rat basolateral amygdala. *Neuroscience* 157:850-863.
- Radnikow G and Misgeld U. 1998. Dopamine D1 receptors facilitate GABA<sub>A</sub> synaptic currents in the rat substantia nigra pars reticulata. *J. Neurosci.* 18:2009-2016.
- Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattachayra SK. 1998. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacol* 135:361-367.
- Ramos A, Berton O, Mormède P, Chaouloff F. 1997. A multiple-test study of anxiety related behaviors in six inbred rat strains. *Behavioural Brain Research* 85: 57-69.
- Rajashree R, Kholkute SD, Goudar SS. 2011. Effects of duration of diabetes on behavioural and cognitive parameters in streptozotocin-induced juvenile diabetic rats. *Malays J Med Sci.* 2011 Oct;18(4):26-31.
- Rebolledo-Solleiro D, Crespo-Ramírez M, Roldán-Roldán G, Hiriart M, Pérez de la Mora M. 2013. Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test. *Physiol Behav.* 12:130-135.
- Rees DA, Alcolado JC. 2005. Animal models of Diabetes Mellitus. *Diabetic Medicine* 22:359-370.
- Rezayof A, Hosseini SS, Zarrindast MR. 2009. Effects of morphine on rat behavior in the elevated plus maze: the role of central amygdala dopamine receptors. *Behav Brain Res* 202: 171-178.
- Robinson R, Krishnakumar A, Paulose CS. 2009. Enhanced Dopamine D1 and D2 Receptor Gene Expression in the Hippocampus of Hypoglycaemic and diabetic rats. *Cell. Mol. Neurobiol* 29: 365-372.
- Rodgers RJ and Dalvi A. 1997. Anxiety, Defense and the Elevated-Plus Maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21:801-810.
- Rodríguez Landa JF y Contreras CM. 1998. Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Rev Biomed* 9:181-191.
- Ronti T, Graziana L, Mannarino E. 2006. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol* 64:355-365.

- Rosenkranz JA and Grace AA. 2002. Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* 22:324-337.
- Royer S, Martina M, Paré D. 1999. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci* 19:10575-10583.
- Sadashiv-Tiwari S, Paul BN, Kumar S, Chandra A, Dhananjai S et al. 2012. Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance. *World J Diabetes* 3:135-141.
- Salim S, Asghar M, Chugh G, Taneja M, Xia Z, Saha K. 2010. Oxidative stress: a potential recipe for anxiety, hypertension and insulin resistance. *Brain Res.* 4:178-85.
- Scarpace PJ, Zhang Y. 2009. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R493-500.
- Scarpace PJ, Matheney M, Kirichenko N, Gao YX, Tümer N, Zhang Y. 2013. Leptin overexpression in VTA trans-activates the hypothalamus whereas prolonged leptin action in either region cross-desensitizes. *Neuropharmacology* 65:90-100.
- Sensi M, Pricci F, Andreani D, Di Mario U. 1991. Advanced nonenzymatic glycation end products (AGE): their relevance to aging and the pathogenesis of late diabetic complications. *Diabetes Res* 16:1-9.
- Sergerie K, Chochol C, Armony JL. 2008. The role of the amygdala in emotional processing: a quantitative meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 32:811-830.
- Sharma S, Fulton S. 2013. Diet-induced obesity promotes depressive-like behavior that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)* 37:382-389.
- Siegel GJ, Alberts RW, Brady ST, Price DI. 2006 *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects.* Elsevier Academic Press. 992. p.p.
- Shaban MC, Fosbury J, Kerr D, Cavan DA. 2006. The prevalence of depression and anxiety in adults with Type 1 diabetes. *Diabet med* 23:1381-1384.
- Shankar PN, Joseph A, Paulose CS. 2007. Decreased [3H] YM-09151-2 binding to dopamine D2 receptors in the hypothalamus, brainstem and pancreatic islets of streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 557:99-105.
- Sharma AN, Elased KM, Garrett TL, Lucot JB. 2010. Neurobehavioral deficits in *db/db* diabetic mice. *Physiol and Behav* 101:381-388.
- Sharma S and Fulton S. 2013. Diet-induced obesity promotes depressive-like behavior that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)* 37:382-389.
- Sommerfield AJ, Deary IJ, Frier BM. 2004. Acute hyperglycemia alters mood state and impairs cognitive performance in people with type 2 diabetes. *Diabetes care* 27:2335-2340.
- Squire LR, Bloom FE, McConell SK, Roberts JL, et al. 2003. *Fundamental Neuroscience.* Academic Press. 1426 p.p.

- Stefanello N, Schmatz R, Pereira LB, Rubin MA, da Rocha JB, Facco G, Pereira ME, Mazzanti CM, et al., 2014. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 388:277-286.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM et al. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312.
- Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S. 2008. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* 4:953-961.
- Surwit RS, Schneider M. 1993. Role of stress in the ethiology and treatment of Diabetes Mellitus. *Psychosom Med* 55:380-393.
- Swanson LW, Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21:323-331.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in the rat pancreas. *Physiol Res* 50:536-546.
- Takeuchi T, Nakao M, Nomura K, Yano E. 2009. Association of metabolic syndrome with depression and anxiety in Japanese men. *Diabetes Metab.* 35:32-36.
- Talalaenko AN, Abramets IA, Starkhovskii Yu V, Shekhovtsov AA, et al.1994. The role of dopaminergic mechanisms on the brain in various models of anxious states. *Neurosci Behav Physiol* 24:284-288.
- Thorré K, Chaouloff F, Sarre S, Meeusen R, et al. 1997. Differential effects of restraint stress on hippocampal 5-HT metabolism and extracellular levels of 5-HT in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res* 772: 209-216.
- Treit D, Menard J, Royan C. 1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44:463-469.
- Vazdarjanova A, Cahill L, McGaugh JL. 2001. Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 14:709-718.
- Velasco M, Larqué C, Gutiérrez-Reyes G, Arredondo R, et al. 2012. Metabolic syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic  $\beta$  cells. *Islets* 4: 302-311.
- Vilchis C, Salceda R. 1996. Effect of diabetes on levels and uptake of putative aminoacid neurotransmitters in rat retina and retinal pigment epithelium. *Neurochem Res* 21:1167-1171.
- Vogel JR, Beer B, Clody DE. 1971. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacol* 21:1-7.
- Volchegorskiĭ IA, Moskvicheva MG, Chashchina EN. 2005. An effect of antioxidant drugs on symptoms of sensomotor polyneuropathy and affective disorders in patients with diabetes mellitus. *ZH Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 105:41-45.
- Volchegorskiĭ IA, Tseilikman VE, Smirnov Ds, Ship SA, Borisenkov AV. 2004. Decreases In glucocorticoid sensivity as a factor of stress-producing changes in the activity of monoamine oxidase, lipid peroxidation and behavior in rats. *Neurosci behav physiol* 34:697-701.
- Vuilleumier P, Armony JL, Driver J, Dolan RJ. 2011. Effects of attention and emotion on face processing in the human brain: an event-related fMRI study. *Neuron* 30:829-841.

- Watanabe, A; Okuno, S; Okano, M; Jordan, S; et al. 2007. Altered emotional behaviors in the diabetes mellitus OLETF type 1 congenic rat. *Brain Res* 1178:114-124.
- Weiss T, Skelton K, Phifer J, Jovanovic T, et al. 2011. Posttraumatic stress disorder is a risk factor for metabolic syndrome in an impoverished urban population. *Gen Hosp Psychiatry* 33:135-142.
- Weiskrantz L. 1956. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49:381- 391.
- Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G.1997. Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet induced obesity. *Diabetes* 46:1782-1785.
- Wilson W, Voigt P, Bader M, Marsden CA, Fink H. 1996. Behavior of the transgenic (mREN2)27 rat. *Brain Res.* 729: 1-9
- Yamamoto Y, Akiyoshi J, Kiyota A, Katsuragi S, et al. 2000. Increased anxiety behavior in OLETF rats without cholecystokinin-A receptor. *Brain Res Bull* 53:789-792.
- Yocoyama M, Suzuki E, sato T, Maruta S, et al. 2005. Amygdalic levels of dopamine and serotonin rise upon exposure to conditioned fear stress without elevation of glutamate. *Neurosci Lett* 379:37-41.
- Zhang Y and Scarpace PJ.2006. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 88:249-256.
- Zhang, Cai-Xia; Chen, Yu-Ming; Chen, Wei-Qing. 2008. Association of psychosocial factors with anxiety and depressive symptoms in Chinese patients with type 2 diabetes. *Diabetes res clin pract* 79:523-530.

### ANEXO 1: Características de las cepas espontáneamente diabéticas como modelos murinos de Diabetes Mellitus tipo 1 y 2

Cepas espontáneamente diabéticas de DM1 más populares en la literatura		
Nombre de la cepa	Características	Usos
<b>Ratones NOD</b>	Se originaron en Japón en los 80's y proveniente de la cepa Jc1:ICR. Presenta hiperglucemia, glucosuria, polidipsia, poliuria; desde las 4-5 semanas desarrolla de insulinitis iniciada por la presencia de linfocitos pancreáticos, seguida de la infiltración de leucocitos (principalmente células T tipo CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> ). Generan anticuerpos contra insulina, GAD e IA-2, así como otras manifestaciones autoinmunes (Síndrome de Sjörgen y tiroiditis). La incidencia que muestra a presentar DM1 es de 60-80% en machos y de 20-30% en hembras	Estudio de mecanismos autoinmunes de la DM1, así como para examinar mecanismos genéticos involucrados en ella. También se utilizan en el estudio de transplantes y tolerancia a transplantes de islotes $\beta$ pancreáticos
<b>Ratas Biobreading (BB)</b>	Originada en Canadá en los años 70's a partir de la cepa Wistar. Presenta anticuerpos contra los islotes pancreáticos y GAD. La insulinitis está presente desde las semanas 2-3 previas a la manifestación clínica caracterizada por la escasez o ausencia de células T tipo CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> . A partir de las 8 semanas presentan hiperglucemia, insulinopenia, poliuria, polidipsia, cetoacidosis severa, que incluso puede ser letal si no se trata con insulina al animal	
<b>Ratas Long Evans Tokushima Lean Rats (LETL)</b>	Se originó en Japón en el año 1991 y proveniente de la cepa Long Evans. Es el primer modelo murino Desarrolla una destrucción autoinmune de las células $\beta$ por infiltración linfocítica, sin presentar linfopenia. Exhibe un establecimiento rápido de poliuria, polifagia, hiperglucemia y disminución del peso corporal. Una sub-cepa obtenida a partir de las LETL (denominada KDP) desarrolla la enfermedad en una tasa muy alta (70% en machos y 80% en hembras)	
Cepas monogénicas espontáneamente diabéticas de DM2 más populares en la literatura		
<b>Ratones <i>ob/ob</i></b>	Presentan una mutación en el gen que codifica para la leptina; lo primero que manifiesta es hiperfagia y una disminución en el gasto energético. Se vuelven obesos a partir de las 4 semanas. Exhiben hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, así como hiperglucemia moderada	Estudios de los mecanismos que generan obesidad mórbida y el papel que juega la leptina en ellos
<b>Ratones <i>db/db</i></b>	Presentan una mutación en el gen que codifica para el receptor de leptina. Son hiperfágicos y obesos desde las 4 semanas aproximadamente. Al igual que los ratones <i>ob/ob</i> , también presenta hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, pero se diferencia en que desde las 4-8 semanas manifiesta hiperglucemia severa debida a la muerte de las células $\beta$ , por lo que no vive más de 8-10 meses	
<b>Ratas <i>fa/fa</i> (Ratas obesas tipo Zucker)</b>	Presentan una mutación en el gen que codifica para la leptina y prácticamente las mismas manifestaciones que los ratones <i>db/db</i> , pero a diferencia de ellos, en estas ratas, se acompañan de hiperlipidemia e hipertensión arterial. Una sub-cepa obtenida de esta, denominada Rata ZDF (Zucker Diabetic Fatty Rat) tiene la característica de que los machos desarrollan hiperglucemia severa a partir de la 8ª semana debido a la apoptosis severa de células $\beta$ y se convierten en insulínopénicos a las 14 semanas de edad.	

(Tabla basada en Chatzigeorgiou et al., 2014)

<b>Cepas poligénicas espontáneamente diabéticas de DM2 más populares en la literatura</b>		
<b>Nombre de la cepa</b>	<b>Características</b>	<b>Usos</b>
<b>Ratones KK (Kuo-Kondo)</b>	Originada en 1967 en Japón, esta cepa presenta hiperfagia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina. Se convierten en obesos de forma gradual a partir de los 2 meses de edad. Presentan hiperglucemia moderada (a casusa del aumento en el tamaño de los islotes pancreáticos). Una sub-cepas heteróciga para el gen amarillo de la obesidad (KK/A <sup>y</sup> ) genera obesidad mórbida e hiperinsulinemia a las 8 semanas	Estudios de los mecanismos etiopatológicos involucrados en el desarrollo de DM2, así como para estudiar nuevas drogas antidiabéticas
<b>Ratones NZO (New Zeland Obese Mouse)</b>	Presenta características similares a las del ratón KK, pero éste también presenta resistencia a la insulina hepática desde temprana edad. Exhibe, además, hiperleptinemia y niveles de glucosa entre 300-400 mg/dL a las 20-24 semanas. Las hembras muestran cierta resistencia a generar DM, pero se usan modelos de hipertensión cuando son sometidas a dietas ricas en grasas	Estudios poligénicos de la obesidad y/o de la relación que hay entre obesidad y diabetes
<b>Ratones NSY</b>	Proviene de la cepa de ratones Jc1:ICR, pero fue seleccionada por su intolerancia a la glucosa. Desarrolla DM en una modalidad dependiente del sexo: el 90% de los machos la presentan, mientras que sólo se presenta en el 30% de las hembras; la severidad de la enfermedad es proporcional a la edad del animal. Exhibe obesidad moderada, caracterizada por acumulación de la grasa visceral que va acompañada de una ligera resistencia a la insulina junto con secreción de la insulina alterada, la cual se desarrolla a partir de las 24 semanas	Estudio del daño causado con la edad, así como las posibles asociaciones genéticas entre la DM1 y DM2, pues comparte un origen común con el ratón NOD
<b>Ratas OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rats )</b>	Es una cepa japonesa deriva da de la cepa Long Evans y se caracteriza por la ausencia del gen que codifica para la CCK-A. Presenta una disminución en la expresión del transportador de glucosa Glut-4 en el músculo. Exhiben obesidad moderada, polifagia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y una hiperglucemia creciente dependiendo de la edad. El desarrollo de la DM se da entre las semanas 18-25	Estudio de nuevas drogas antidiabéticas y/o antihipertensivas
<b>Otros modelos murinos de DM2 mencionados en la literatura</b>		
<b>Ratones Ins2<sup>Akita</sup></b>	Presentan una mutación espontánea en el gen INS2, que es homólogo al gen de la preproinsulina presente en el humano. Exhiben polifagia, polidipsia, poliuria, hipoinsulinemia progresiva e hiperglucemia desde las 3-4 semanas. Muestra una disminución de la masa celular en los islotes sin la presencia de insulinitis. Se caracteriza por no desarrollar obesidad	Estudios de transplantes de páncreas, principalmente
<b>Ratas GK (Goto-Kakizaki)</b>	Cepa seleccionada de la cepa Wistar que presentaba intolerancia a la glucosa moderada por varias generaciones. Presentan intolerancia a la Glucosa, resistencia a la insulina y secreción de insulina alterada. Son normolipidémicas. Exhibe una disminución de la masa de los islotes pancreáticos al nacimiento, a causa de una proliferación anormal de las células β y apoptosis anormal. Los niveles de glucosa se elevan a partir de las 3-4 semanas y, generalmente, los valores de glucosa en ayunas permanecen estables, a menos que se sometan a un reto de glucosa. Las ratas adultas nunca desarrollan obesidad, pero sí una pérdida del 60% de la masa celular de los islotes pancreáticos tipo β, por lo que algunos consideran que ésta es una limitante para que considerarlo un modelo de DM2	Estudios poligénicos de la obesidad y/o de la relación que hay entre obesidad y diabetes, así como de los mecanismos involucrados en el desarrollo de las complicaciones de la DM (retinopatías, nefropatías, lesiones en nervios periféricos, entre otras)

(Tabla basada en Chatzigeorgiou et al., 2014)



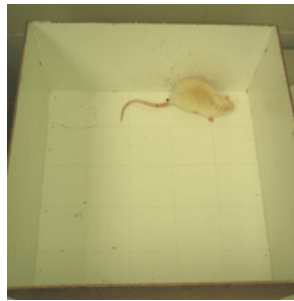
## ANEXO 2: Pruebas conductuales

**-Laberinto elevado en forma de “+” (EPM):** Esta prueba explota el miedo innato de los roedores a espacios abiertos carentes de indicios tigmotácticos [Treit et al., 1993]. La prueba se realizó en un aparato de madera, construido de acuerdo a lo reportado por Pellow y col. en 1985. El artefacto usado posee cuatro brazos, dos de ellos abiertos (50x10 cm) y dos cerrados por paredes laterales (50x10x40 cm), con la parte superior abierta. Dichos espacios tienden a ser explorados diferencialmente por los animales dependiendo de sus niveles de ansiedad. Los parámetros evaluados que denotan ansiedad en esta prueba son: el tiempo de permanencia y el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (BA) [Pellow et al., 1985]. Por lo anterior, se asume que a mayor número de entradas y tiempo de permanencia en los BA del laberinto, menor será la ansiedad que el animal posee [Henninger et al., 2000]. Dichos parámetros se incrementan con la administración de fármacos ansiolíticos [Pellow et al., 1985]. La cuantificación del número de entradas totales tanto a los brazos abiertos como cerrados del laberinto representa un índice de la locomoción de los animales en esta prueba [Pellow et al., 1985]. Este modelo es uno de los más populares en la literatura, pues sin ser una técnica invasiva, induce un tipo de ansiedad similar al trastorno por ansiedad generalizada [Rodgers y Dalvi, 1997]. Inicialmente, se coloca al animal en la plataforma central y se permite que los roedores exploren los distintos brazos del aparato por 5 minutos. Durante el experimento se controla la intensidad de la luz entre 2.3 y 2.5 luxes. Al finalizar dicha prueba, con el objeto de descartar alteraciones motoras que pudieran haber influido en la exploración del laberinto, se midió la locomoción del animal durante 5 minutos en un campo abierto (ver a continuación).



**Fotografía del aparato utilizado en el modelo de Laberinto Elevado en Forma de “+”**

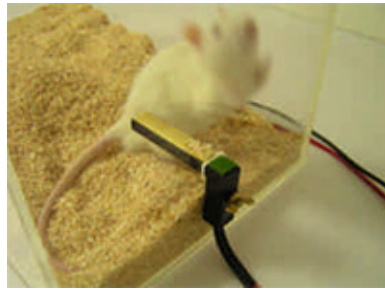
- **Campo abierto (OFT):** es un aparato que se compone por una superficie blanca, con forma cuadrada y cuyas dimensiones son 50x50 cm, la cual está rodeada por paredes de acrílico de 30 cm de altura y soportan un marco metálico. Durante la prueba, la luz es controlada a 175 luxes. Esta prueba se utilizó con dos fines: para cuantificar la locomoción de los animales y para determinar la ansiedad de los mismos, en ensayos distintos. La locomoción de los animales se monitorea durante 5 minutos con ayuda de sensores de luz localizados cada 5 cm en los cuatro lados del marco, el cual presenta en un extremo emisores de luz y en el extremo opuesto, receptores. El registro de la locomoción se realiza mediante un software especializado (1 Omni-Alba/AOBiomed, México) que registra la posición del animal en un eje de coordenadas "X-Y" cada vez que éste se mueve y "corta" los haces de luz emitidos por el marco. Por otro lado, para determinar la ansiedad de los animales en este dispositivo, se realiza una cuantificación "off-line" de la cantidad de segundos que el animal pasa en los cuadros periféricos de la superficie (los que tienen contacto con las paredes de la caja) en comparación con los cuadros centrales de la misma (aquellos que no tienen contacto con las paredes de la caja). La determinación conductual se realizó como se ha reportado anteriormente, considerando que una mayor duración en los cuadros centrales del campo denota menores niveles de ansiedad, que cuando el animal pasa más tiempo en los cuadros periféricos [Carola et al., 2002].



**Fotografía del aparato utilizado en el modelo de campo abierto**

- **Enterramiento defensivo (ED):** es una prueba en la que se explota la tendencia natural de los roedores a enterrar todo aquello que les resulta aversivo o potencialmente peligroso (ver en De Boer y Koolhaas, 2003). Durante este procedimiento conductual los animales reciben una descarga eléctrica de baja intensidad (0.4 mA) a través de un electrodo (7cm de largo x 0.5 cm de diámetro) permanentemente electrificado que emerge de una de las paredes de la cámara de experimentación (caja de acrílico de 27x16x23 cm). Al inicio de la prueba, y tras de recibir la primera descarga, el animal se aleja del electrodo y después de un período de tiempo variable (latencia) comienza a esparcir el aserrín que contiene la cámara de experimentación (cama de 5 cm) en dirección a éste con el objeto de enterrarlo realizando movimientos muy marcados con sus extremidades delanteras (conducta de enterramiento). Esta conducta usualmente se repite en varias ocasiones durante la prueba. La duración de la prueba es de 10 minutos y los parámetros que se cuantifican son: a) el tiempo total de enterramiento; b) la latencia al primer episodio de enterramiento, c) el número total

de choques eléctricos que el animal recibe durante la prueba y d) el tiempo que el animal permanece realizando conductas de congelamiento. La conducta de enterramiento y el tiempo de congelamiento se han tomado como un parámetro de ansiedad activa y pasiva, respectivamente, mientras que el tiempo de latencia se considera un índice de la reactividad del animal ante la condición aversiva que experimenta; el número total de choques es un índice del grado de dolor o molestia que el animal siente durante la prueba [Treit et al., 1994, Fernández-Guasti et al., 2001].



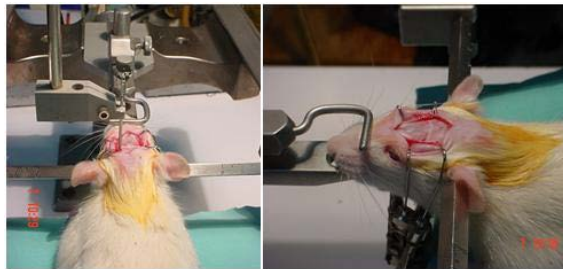
**Fotografía del aparato utilizado en el modelo de enterramiento defensivo**

En todos los casos, durante las pruebas conductuales, los animales fueron alojados en un cuarto con temperatura controlada ( $23 \pm 1^\circ \text{C}$ ), con un ciclo de luz-obscuridad 12:12 y con acceso libre a agua y alimento, cuyo consumo fue registrado antes y durante los periodos de habituación, por 8 días consecutivos. Antes de la prueba conductual los sujetos de estudio fueron habituados a la manipulación experimental por un periodo de 5 minutos durante 3 días consecutivos (4 en el caso del ED). La noche previa al experimento los animales fueron alojados en el cuarto donde se llevaron a cabo las pruebas conductuales para minimizar los factores que pudieran afectar sus niveles de ansiedad. Las pruebas conductuales se llevaron a cabo entre las 9 y 15 hrs. y fueron videograbadas para la evaluación “off-line” de los parámetros señalados anteriormente. Al término de estas pruebas, los animales se pesaron y se les determinó la concentración de glucosa en sangre, con ayuda de un glucómetro y un sistema de tiras reactivas Acutek [Roche].

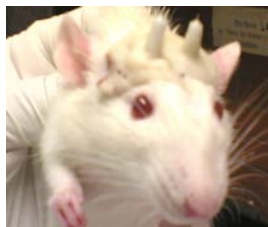
**Análisis estadístico.** Los resultados se expresan como los promedios $\pm$ ESM y fueron analizados mediante el paquete estadístico GraphPad Prism versión “V”. Dado que de acuerdo a la prueba de Kolmogorov-Smirnov los distintos grupos bajo comparación poseían una distribución normal y las comparaciones se realizaron entre los promedios de dos grupos independientes, la significancia estadística de los resultados se evaluó en todos los casos mediante una prueba “t” de Student de dos “colas” para datos no pareados. La significancia estadística se fijó a  $P < 0.05$

### **ANEXO 3: Inyección intra-admigdalina de SCH23390 en animales tratados con estreptozotocina**

**Cirugía:** Los animales utilizados (n=53) fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (170 mg/kg, i.p.; Pisa Agropecuaria). La cabeza de los animales fue rasurada y se colocaron en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, Tujunga CA, E.U.A.) con la barra incisiva colocada a -3.3 mm. Con el objetivo de disminuir el sufrimiento de los animales, se administró lidocaína al 10% en spray (Xilocaina Spray, Astra Zeneca, México) antes de la incisión. La superficie del cráneo fue limpiada y a través de orificios practicados en él, se implantaron de forma bilateral cánulas guía de acero inoxidable (Plastic One mod. C315DC, Ronoake, E.U.A.; diámetro externo: 0.46mm, diámetro interno: 0.24mm; 26 gauge), utilizando de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson (2004) las siguientes coordenadas: AP: -2.12 mm, L:  $\pm$  4.5 mm, V: -7.7 mm. Las cánulas guía se fijaron al cráneo de las ratas utilizando tres tornillos de acero inoxidable y acrílico dental (Acrimin Autocurable, Laboratorios Arias, México). Al término del procedimiento se insertó dentro de las cánulas un “mandril” (Dummy Canulae Plastic One mod. C315DC), para asegurar la permeabilidad de las cánulas guía y se aplicó a los animales antibiótico (1 ml. i.m. Fortabencetacil L.A., Fort Dodge Animal Health Laboratorios, México), para evitar infecciones. Finalmente, los animales se colocaron en cajas individuales con agua y comida ad libitum y fueron alojados en un vivarium durante su recuperación.



**Fotografía de una rata colocada en el aparato estereotáxico durante la cirugía**



**Fotografía de una rata canulada después de la cirugía**

[Fotografías tomadas de Nuche-Bricaire, 2008]

**Grupos experimentales:** una vez operados y recuperados, los animales fueron escogidos azarosamente para formar los grupos experimentales, los cuales estuvieron constituidos de la siguiente manera:

**-Grupo control (CONT):** administrado con buffer de citratos i.p. 10 días antes de las pruebas conductuales e inyectados con solución salina fisiológica por la vía intra-amigdalina 5 minutos antes de las pruebas conductuales; n=19.

**-Grupo diabético (STZ):** administrado con STZ i.p. 10 días antes de las pruebas conductuales e inyectados con solución salina fisiológica por la vía intra-amigdalina 5 minutos antes de las pruebas conductuales; n=14.

**-Grupo diabético tratado con SCH23390 (STZ+SCH23390):** administrado con STZ i.p. 10 días antes de las pruebas conductuales e inyectados con SCH23390 (100 ng/lado) por la vía intra-amigdalina 5 minutos antes de las pruebas conductuales; n=20.

Tras la recuperación de la cirugía estereotáxica (cinco días), los animales fueron inyectados con STZ (50 mg/kg), por dos días consecutivos. Cuatro días previos a las pruebas conductuales, los animales fueron manipulados diariamente con el fin de habituarlos al experimentador, así como a las condiciones experimentales. Durante la manipulación se simuló la infusión intra-amigdalina de las soluciones, y los animales fueron colocados por 10 minutos en la caja de enterramiento defensivo sin el electrodo. Los animales estudiados permanecieron en el cuarto de conducta durante todo el proceso de habituación, para disminuir la variabilidad ambiental y, minimizar así sus niveles basales de ansiedad.

**Micro-infusión intra-amigdalina de SCH23390:** El día de las pruebas conductuales, se insertaron en las cánulas guía sendos inyectores (Plastic One, mod. C3151, Roanoke, E.U.A.; diámetro interno: 0.1 mm, 33 gauge), cuya punta sobresalía 1 mm de la cánula guía. Dichos inyectores estaban conectados a una tubería (Plastic One C1315C5, Roanoke, E.U.A., Vinyl+Spring, 40 cm) que, con ayuda de una bomba de micro-inyección (CMA microdialysis, mod.CMA/100, Estocolmo, Suecia), permitió el flujo al interior de los núcleos amigdalinos de las soluciones administradas (SCH23390 o solución salina fisiológica, en el caso del grupo control). El volumen inyectado fue de 250 nL por lado, durante 5 minutos. Al finalizar el procedimiento, los inyectores se mantuvieron dentro de las cánulas guía durante 1 minuto, para garantizar una buena difusión de la sustancia y evitar su flujo reverso.

**Pruebas conductuales (enterramiento defensivo y campo abierto):** Inmediatamente después de la micro-inyección, los animales se colocaron en la caja de enterramiento defensivo con su electrodo permanentemente electrificado y su conducta fue evaluada como, como se describió previamente. Al finalizar la prueba, se colocó al animal en la prueba de campo abierto, y se midió su actividad locomotora de la manera como se describió antes.

**Análisis histológico:** Una vez concluido el procedimiento experimental, los animales fueron sacrificados administrándoles una dosis letal de pentobarbital sódico (Laboratorios Tokkyo, México) y se decapitaron para extraer su cerebro, los cuales se fijaron en una solución de formaldehído al 10%. Los cerebros permanecieron en este fijador por algunas semanas y, posteriormente, se colocaron en soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30% en días consecutivos, para poder ser rebanados coronalmente en secciones de 40  $\mu\text{m}$ , con ayuda de un criostato (CM 1510-3, Leica Instruments, Nussloch, Alemania). Para saber con precisión la posición de las cánulas guía en los cerebros de los animales utilizados, los cortes obtenidos se tiñeron con la técnica de Nissl, utilizando violeta de cresilo. Los cortes teñidos se analizaron bajo microscopio y sólo se incluyeron en el análisis estadístico los resultados aquellos animales cuyas dos cánulas estuvieron localizadas dentro del complejo amigdalino y al menos una de ellas entre el núcleo basolateral y el central de la amígdala.

**Análisis estadístico:** Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  su error estándar y fueron analizados mediante el paquete estadístico GraphPad Prism versión "V". Dado que de acuerdo a la prueba de Kolmogorov-Smirnoff los distintos grupos bajo comparación poseían una distribución normal, el análisis estadístico se realizó mediante la aplicación de una ANOVA de una vía ( $P < 0.05$ ), seguida en caso necesario de la prueba post-hoc de Tukey para establecer las diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

#### ANEXO 4. ESTUDIOS QUE RELACIONAN LA DIABETES Y/O EL SÍNDROME METABÓLICO Y LA ANSIEDAD EN ROEDORES (1990-2014)

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Hilakivi, et al. 1991	Ratón NIH Swiss. Machos, 22g. n=19	DM1: STZ, 200 mg/kg, i.p., Única dosis	- Holeboard - EPM - Residente-intruso - Nado forzado	- EPM construido con Plexiglass. - La prueba de EPM se realizó después de la de holeboard, 19 días después de la inyección con STZ.	- Los ratones tratados con STZ mostraron los siguientes cambios conductuales: - Holeboard: ↓ de la actividad locomotora; no se observan cambios significativos en el no. de veces que el animal asoma la cabeza a los agujeros. - EPM: no se reportan cambios significativos en el tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto, pero se reporta un ↑ en el no. total de entradas (brazos abiertos+cerrados). - Residente-intruso: se observó una tendencia a ↓ el tiempo de interacción social y a ↑ las conductas agresivas hacia el individuo "intruso" - Nado forzado: ↑ tiempo de IMO
Chauloff, 1994	Ratas obesas tipo Zucker (fa/fa); los controles son de la misma cepa, pero delgados Machos de 10 semanas N=10 por grupo	DM2/SM: ratas obesas, hiper-insulinémicas, resistentes a la insulina	- EPM - Caja luz-obscuridad - Campo abierto	- EPM y caja luz-obscuridad construido con Perspex	- Se reporta una tendencia de las ratas obesas a aumentar el tiempo de exploración en los brazos abiertos del EPM y el tiempo de permanencia en el compartimento iluminado en la caja luz-obscuridad. - No se registraron cambios significativos en la locomoción de las ratas obesas medida en el campo abierto.
Thorré, et al. 1997	Ratas Wistar, macho. 230-260g. n=12	DM1: STZ 65mg/kg, i.p., Única dosis	- IMO (1h) - EPM - Locomoción en cajas individuales	- Pruebas realizadas 3 semanas después de la inyección de STZ. - El EPM construido con Perspex; la prueba se realizó después de 1h de IMO.	- EPM: los animales tratados con STZ mostraron una ↓ tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto. - Locomoción: el tratamiento con STZ ↓ la actividad locomotora de los animales diabéticos, tanto en esta prueba de locomoción, como en el EPM.
Ramanathan, et al. 1998	Ratas Charles Foster albinas. Machos y hembras. 120-180 g. n=6-7	DM1: STZ 50 mg/kg, i.p. Única dosis	- Campo abierto - EPM - LE-0 - Interacción social	- Pruebas realizadas 72h después de la inyección con STZ.	- Los animales tratados con STZ mostraron los siguientes parámetros conductuales: - Campo abierto: ↓ actividad locomotora - EPM: ↓ tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto - LE-0: ↓ head dipping . - Interacción social: ↓ tiempo de interacción. - Se reportó un efecto atenuado del Diazepam en los individuos diabéticos.

**Abreviaturas:** DM: diabetes mellitus; DM1: diabetes mellitus tipo 1; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; LE-0: laberinto elevado en forma de cero; IMO: inmovilización (estrés por restricción al movimiento); SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Yamamoto, et al. 2000	Ratas OLETF (diabéticas) Controles: Ratas LETO Machos 210-360 g n=20	DM2/SM: Las ratas OLETF muestran obesidad, pruebas de intolerancia a la glucosa alterada e hiperglucemia tardía	- EPM - Caja luz-obscuridad - Campo abierto (2h)	- EPM construido con plástico no transparente, elevado a 75 cm del piso. La duración de la prueba fue de 240 seg.	- Las ratas OLETF mostraron los siguientes cambios conductuales: -EPM: una ↓ en tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto, un ↑ en el no. de elongaciones y una ↓ en el no. de entradas totales (brazos abiertos+cerrados del laberinto). - Caja luz-obscuridad: se registró una ↓ de tiempo en el lado iluminado de la caja, así como el no. de transiciones entre el compartimento oscuro y el iluminado. -Campo abierto: no se encontraron diferencias en la locomoción.
Harris, et al. 2001	Ratón transgénico BAPa. Machos. 12 semanas (30 g). n= 10 BAPa (heterócigos). n= 14 tipo silvestre.	DM2/SM: el ratón BAPa presenta una expresión ectópica de la proteína Agouti y fenotipo diabético (obesidad e hiperinsulinemia)	- IMO (12 min), - Evasión defensiva, - caja luz-obscuridad y - EPM.	- Las pruebas conductuales se realizaron después de 12 min. de IMO.	-Los ratones BAPa mostraron los siguientes cambios conductuales: -Caja luz-obscuridad: ↓ no. de salidas del compartimento oscuro. -EPM: ↓ tiempo y no. entradas a los brazos abiertos del laberinto. - Evasión defensiva: ↑ latencia a salir de la cámara, ↓ no. de salidas de la cámara, parámetros que denotan un perfil ansiogénico.
Kamei, et al. 2001	Ratones ICR. Machos, 20 g. n=226 (para cada grupo)	DM1: STZ 200 mg/kg,i.p., Única dosis	- "Holeboard" (campo abierto con agujeros).	- Aparato de madera. - Cada animal se utilizó sólo una vez. - Prueba con duración de 5 min.	-Los animales tratados con STZ mostraron una ↓ en la actividad exploratoria en esta prueba; se observó también una en ↓ las conductas de "head-dipping"(asomar la cabeza a los agujeros), lo que denota un perfil ansiogénico. - Se encontró un efecto atenuado del Diazepam en los individuos diabéticos.
Li, et al. 2002	Ratas OLETF (diabéticas) y LETO (controles). Macho, 4 semanas. 500-600 g. n=10 para cada grupo.	DM2/SM: Ratas OLETF son intolerantes a la glucosa y medianamente obesas. Desarrolla DM en etapa adulta.	- Laberinto en agua de Morris, - Prueba de evasión inhibitoria, - Plato caliente, - Neofobia, alimentaria y - EPM	- La cepa OLETF presenta una delección del gen que codifica para el receptor CCK-A.	-Las ratas tipo OLETF mostraron los siguientes cambios conductuales: -Laberinto de Morris: Las ratas OLETF muestran una ↓ en la capacidad de aprendizaje. - Plato caliente: ↑ latencia para quitar la cola del plato caliente (hipoalgesia) - Neofobia limentaria: ↑ fobia a nuevos alimentos -EPM: ↓ tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del EPM. - Además, estas ratas exhibieron hipoactividad en algunas de las pruebas realizadas (Laberinto de Morris y el EPM).
Akasawa, et al. 2003	Ratones C57BL/6J (control) y ob/ob (diabéticos). Machos y hembras. 62-69 g. n=6-7	DM2/SM: ratones ob/ob son obesos, carecen de leptina y son y resistentes a la insulina.	- EPM en su versión para ratón.	- Tratamiento en los ratones ob/ob con leptina exógena.	- Los ratones ob/ob muestran un perfil ansiogénico en el EPM. -La conducta ansiosa de los ratones ob/ob es atenuada al administrar leptina exógena, la cual produce un ↑ en el tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del EPM en estos animales.

**Abreviaturas:** DM: diabetes mellitus; DM1: diabetes mellitus tipo 1; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilidad; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.



REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Akasawa et al., 2007	Ratones C57BL/6 (control), Ratones Ins <sup>2Akita</sup> (diabéticos). Machos, 7-8 semanas. n=5-6	DM2/SM: los Ratones Ins <sup>2Akita</sup> son hiperglucémicos, no obesos.	- EPM en su versión para ratón y - Campo abierto (de arena circular).	- La prueba de EPM se realizó entre las 22 y 24 hrs. - La prueba de campo abierto tuvo una duración de 3 minutos.	-EPM: los ratones Ins <sup>2Akita</sup> mostraron una ↓ en el tiempo y no. entradas a los brazos abiertos del laberinto; ↓ el no. total de entradas (brazos abiertos+cerrados del laberinto). -Campo abierto: los ratones Ins <sup>2Akita</sup> mostraron un ↑ tiempo de IMO y una ↓ en la actividad locomotora. - Se midieron también los niveles de expresión del ARNm de distintos neuropéptidos en los núcleos arcuatos del hipotálamo, observando un marcado ↑ en los niveles de ARNm de AgRP y una ↓ significativa en los de POMC.
Watanabe et al., 2007	Ratas OLETF “normales” y ratas “mutantes”, provenientes de una cepa congénita de ratas OLETF, que contiene una mutación en el receptor GPR10 en el hipotálamo. n=7-10	DM2/SM: las ratas OLETF son intolerantes a la glucosa y medianamente obesas. Desarrollan DM en etapa adulta	-EPM, -Campo abierto y -Evasión defensiva		- EPM: Las ratas mutantes mostraron un ↑ en el tiempo y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto. -Campo abierto: las ratas mutantes exhibieron un ↑ en la locomoción. -Evasión defensiva: las ratas mutantes mostraron una ↓ en la latencia a desalojar el compartimento iluminado y un ↓ en el tiempo que permanecían en un compartimento oscuro de la caja. - El receptor GPR10 (expresado en el núcleo reticular y paraventricular del hipotálamo) puede ser un blanco farmacológico adecuado para el tratamiento de los desórdenes de ansiedad y/o estrés, ya que la activación de este receptor por su péptido endógeno (prolactin-related peptide), modula la actividad del eje HHA.
Nishimura et al., 2009	Ratones doble mutantes IA-2/IA-2β, deficientes de proteínas asociadas a los islotes pancreáticos (IA-2) y de los principales auto-antígenos presentes en la diabetes tipo 1 (IA-2β)	DM1: Los ratones mutantes muestran alteraciones en pruebas de tolerancia a la glucosa, así como en la secreción de insulina; no. de células β reducido	-Plataforma elevada -Campo abierto -Condicionamiento por aversión al sabor y olfativo -Prueba de suspensión de la cola		- Los ratones KO mostraron los siguientes cambios conductuales: -Plataforma elevada: un ↑ en la latencia a descender de la plataforma cuando ésta era más alta. -Campo abierto: una ↓ en la frecuencia de visitas a los cuadros centrales de la arena. La locomoción horizontal y vertical también se encuentra ↓. -Condicionamiento por aversión al sabor y olfativo: extinción acelerada del aprendizaje condicionado. -Prueba de suspensión de la cola: los animales KO mostraron mayor tiempo de IMO, en comparación con los ratones silvestres. -La fluoxatina y el bupropion (anti-depresivos) mostraron un efecto atenuado en los animales KO.

**Abreviaturas:** DM: diabetes mellitus; DM: diabetes mellitus; DM1: diabetes mellitus tipo 1; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de “+”; IMO: inmovilidad; KO: animales knockout; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Marks et al., 2009	Ratones C57BL/6 sometidos a una dieta rica en grasas durante 12 meses P41-P51, n=5 por grupo	DM2/SM: los animales sometidos a la dieta rica en grasas mostraron un incremento en los niveles de glucosa e insulina a causa del tratamiento	-Caja luz-obscuridad -EPM -Enterramiento de canicas	-Administración de insulina por vía intra-nasal durante 5 días	-Los animales sometidos a una dieta rica en grasas mostraron un perfil ansiogénico en las tres pruebas conductuales realizadas: -Caja luz-obscuridad: ↓ en el tiempo que el animal pasaba en el compartimento iluminado. -Enterramiento de canicas: ↑ en el no. de canicas enterradas. -EPM: ↓ en el tiempo que el animal pasaba en los brazos abiertos del laberinto y en el no. de entradas (brazos abiertos+cerrados). -Los animales sometidos a la dieta rica en grasas y que fueron tratados con insulina intra-nasal mostraron una disminución en los niveles de ansiedad en las 3 pruebas conductuales evaluadas.
Abraham et al., 2010	Ratas Wistar macho 200-250 g n=6-8 por grupo	DM1: STZ 55 mg/kg (admon. por vía intrafemoral) Única dosis	-EPM	-Las pruebas conductuales se realizaron 15 días posteriores al tratamiento con STZ - Se probó el efecto del tratamiento con piridoxina y un extracto de la hoja de una planta utilizada tradicionalmente en medicina ayurbédica, llamada <i>Aegle marmelosa</i>	-EPM: los animales tratados con STZ mostraron un perfil ansiogénico: una ↓ en el tiempo de exploración en los brazos abiertos del laberinto, así como en el no. de entradas a estos espacios. - El perfil ansiogénico en las ratas diabéticas fue revertido por el tratamiento combinado con piridoxina y el extracto de <i>A. marmelosa</i>
Finger et al., 2010	Ratones C57BL/6J (control) y ob/ob (diabéticos). Machos y hembras 5 semanas de edad n=12 por grupo	DM2/SM: los ratones ob/ob son obesos, carecen de leptina y son y resistentes a la insulina	-Caja luz-obscuridad -Prueba de hiponeofagia	-Los procedimientos conductuales se realizaron en un periodo de 34 días	-Caja luz-obscuridad: los ratones ob/ob mostraron una ↓ en el porcentaje de tiempo que el animal pasaba en el compartimento iluminado del aparato, así como en el no. de transiciones hacia uno y otro lado de la caja. -Hiponeofagia: los ratones ob/ob mostraron un perfil ansiogénico en esta prueba, caracterizado por un ↑ en la latencia para iniciar a comer en un espacio con poca luz. No se encontraron diferencias cuando la prueba fue realizada con un espacio muy iluminado.
Jung et al., 2010	Ratones ICR machos 20-30 g n=15	DM1: STZ 100 mg/kg, i.p., Única dosis	-EPM -Prueba de evasión pasiva	- Las pruebas conductuales se realizaron 1 semana después a la inyección de STZ	-Los ratones tratados con STZ mostraron los siguientes cambios: -EPM: una ↓ tanto en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto, como en el no. de entradas realizados a estos espacios. -Prueba de evasión pasiva: una ↓ en la latencia para entrar al compartimento oscuro de la caja, donde el animal recibe un choque eléctrico, lo cual indica fallas en la consolidación de la memoria en estos animales.

**Abreviaturas:** DM1: diabetes mellitus; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilidad; L-Y: laberinto elevado en forma de Y; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Sharma et al., 2010	Ratones obesos de la cepa C57BL/KsJ (db/db, n=12-13) y sus respectivos controles flacos (n=18-20). Juvenil: 5-7 semanas Adultos: 10-11 semanas	DM2/SM: los ratones db/db son obesos, hiperglucémicos, hiperinsulinémicos, hiperfágicos y polidípsicos	-EPM -Campo abierto -Nado forzado -Prueba de psicosis de pre-pulsos inhibidos (PPI) -L-Y		-EPM: los ratones db/db tanto juveniles, como adultos, mostraron un perfil ansiolítico en esta prueba, caracterizado por un ↑ en el tiempo de exploración y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto. -Campo abierto: no se observaron cambios significativos en el tiempo que los animales pasaron en los cuadros centrales vs. periféricos de la arena, ni en los individuos juveniles, ni en los adultos. Se reportó una ↓ en la locomoción de los animales en esta prueba conductual. -Nado forzado: los ratones db/db tanto juveniles, como adultos mostraron un ↑ en el tiempo de IMO -PPI: Los ratones db/db adultos mostraron una ↓ en el porcentaje de pulsos inhibidos, medida considerada como un síntoma de psicosis. -L-Y: no se registraron cambios estadísticamente significativos entre los grupos experimentales.
Can et al., 2011	Ratas Wistar 200-250g n=7 por grupo	DM1: STZ 60 mg/kg (admon. por vía intravenosa) Única dosis	-EPM -Actividad locomotora espontánea -Nado forzado -Prueba de evasión activa	-Las pruebas conductuales se realizaron 3 días posteriores a la inyección de STZ - Se evaluaron los efectos de un extracto alcohólico de las partes aéreas de la planta <i>Hypericum perforatum L.</i> en dosis de 125 y 250 mg/kg	-Los animales tratados con STZ mostraron los siguientes cambios conductuales: -EPM: ↓ tanto en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto, como en el no. de entradas realizados a estos espacios. -Actividad locomotora espontánea: ↓ en la actividad locomotora -Nado forzado: ↑ en el tiempo de IMO -Evasión activa: ↑ en la latencia y una ↓ de respuestas evasivas en una cámara en la que reciben choques eléctricos, estas medidas indican fallas en los procesos de memoria y aprendizaje en ellos. -El extracto de <i>H. perforatum L.</i> produjo efectos ansiolíticos y anti-depresivos en los animales tratados con STZ, probablemente a causa de los efectos "anti-diabéticos" producidos por el extracto.
Husain et al., 2011	Ratas Charles Foster 180-190g	DM1: STZ 65 mg/kg, i.p., Única dosis	-EPM -Campo abierto (como prueba de locomoción) -Nado forzado	-Las pruebas conductuales se realizaron 14 días posteriores a la inyección con STZ -Se probó el efecto de un extracto hidroalcohólico de <i>Hypericum perforatum</i> en dosis de 100 y 200 mg/kg	-Los animales tratados con STZ mostraron los siguientes cambios conductuales: -EPM: ↓ tanto en el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto, como en el no. de entradas realizados a estos espacios. -Campo abierto: ↓ en la locomoción de los animales medida en su componente horizontal y una ↓ en el tiempo de exploración de los cuadros centrales de la arena. -Nado forzado: ↑ en el tiempo de IMO -El tratamiento con <i>H. perforatum</i> produjo efectos ansiolíticos y anti-depresivos en los animales tratados con STZ

**Abreviaturas:** DM1: diabetes mellitus; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilización; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina;  
 ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Rajashree et al., 2011	Ratas Wistar macho y hembra, Juveniles 45-50g	DM1: STZ 50 mg/kg, i.p., Única dosis	-EPM con un protocolo especial para medir ansiedad y aprendizaje en el mismo aparato	-Las pruebas conductuales se realizaron 10 y 20 días posteriores a la inyección de STZ	-Los animales tratados con STZ mostraron una ↓ tanto en el tiempo en los brazos abiertos del laberinto, como en el no. de entradas realizados a estos espacios, tanto a los 10, como a los 20 días. -En el protocolo de aprendizaje realizado en el EPM se observó que los animales tratados con STZ mostraron un ↑ en la latencia para abandonar los brazos abiertos del laberinto y transferirse a los brazos cerrados del aparato. Estas observaciones denotan una deficiencia en la capacidad de aprendizaje en estas ratas, tanto a los 10, como a los 20 días.
Aksu et al., 2012	Ratas albinas, hembras n=7 por grupo	DM1: STZ 65 mg/kg, i.p., Única dosis	-EPM -Campo abierto	-Las pruebas conductuales se realizaron 16 días después de la inyección de STZ	-EPM: los animales tratados con STZ mostraron una ↓ en el tiempo que pasaban en los brazos abiertos del laberinto. -Campo abierto: los animales mostraron una ↓ en el no. de entradas a los cuadros centrales de la arena. No se observaron cambios significativos en la actividad locomotora al compararse con los controles. -Los animales tratados con STZ mostraron una ↓ en los niveles plasmáticos de IGF-1 (insulin-like grow factor-1) y un ↑ en los de CORT. Además, exhibieron un ↑ en el no. de neuronas apoptóticas en la corteza prefrontal. -Se observó una ↓ en los niveles de la enzima superóxido dismutasa en esta región cerebral, acompañado de un ↑ en los niveles de malondialdehído (indicadores de estrés oxidativo). -El tiempo de exploración en los brazos abiertos del laberinto correlacionó positivamente con los niveles de IGF-1 en la corteza prefrontal. Por lo tanto, se sugiere que las estrategias terapéuticas que produzcan un ↑ en los niveles de IGF-1 (plasmáticos y cerebrales) puede prevenir las secuelas psiquiátricas observadas en los pacientes con DM.
Ho et al., 2012	Ratones C57BL/6J machos 8 semanas de edad n=8-10 por grupo	DM1: STZ 195 mg/kg, i.p., Única dosis	-LE-0 -Prueba de suspensión de la cola -Actividad locomotora espontánea	Las pruebas conductuales se realizaron entre 2 y 3 semanas después de la inyección de STZ	-En los ratones tratados con STZ exhibieron las siguientes conductas: -LE-0: no se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales; la administración de insulina exógena tampoco produjo cambios significativos. -Prueba de suspensión de la cola: se registró un ↑ en el tiempo de IMO -Actividad locomotora espontánea: ↓ en la actividad locomotora, la cual no pudo ser revertida con la administración de insulina exógena.

**Abreviaturas:** CORT: corticosterona; DM1: diabetes mellitus; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilidad; LE-0: laberinto elevado en forma de cero; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Rebolledo-Solleiro et al., 2013	Ratas Wistar macho 250-280g n=22	DM1: STZ 100 mg/kg, dividida en dos dosis consecutivas de 50 mg/kg, i.p.	-EPM -Campo abierto	Las pruebas conductuales se realizaron 5 y 10 días posteriores al tratamiento con STZ	- Los animales probados 5 días posteriores al tratamiento con STZ no mostraron cambios estadísticamente significativos en ninguna de las pruebas realizadas. -Los animales probados 10 días posteriores al tratamiento con STZ mostraron los siguientes cambios conductuales: -Un ↑ en el consumo de agua, comparable al de animales restringidos del vital líquido por 48 y 72 hrs. - EPM: las ratas tratadas con STZ mostraron un ↑ en el tiempo de exploración y no. de entradas a los brazos abiertos del laberinto -Campo abierto: se observó un ↑ en el tiempo que el animal pasaba realizando conductas de congelamiento y una ↓ en el tiempo que exploraba los cuadros centrales de la arena.
Sharma y Fulton, 2013	Ratones C57Bl/6, machos, adultos, sometidos a una dieta rica en grasas y azúcares durante 12 semanas n=8-12 por grupo	DM2/SM: los animales con la dieta rica en grasas muestran un incremento del peso corporal del 40% aprox.	-EPM -Campo abierto -Nado forzado -Actividad locomotora espontánea - IMO (4 minutos)		-Los animales sometidos a la dieta rica en grasas y en azúcares mostraron niveles basales altos de CORT tanto en reposo, como después de la prueba de estrés por IMO. Además, se observaron los siguientes cambios conductuales en ellos: -EPM: ↓ el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto -Campo abierto: ↓ en el tiempo y no. de entradas a los cuadros centrales de la arena -Nado forzado: ↑ tiempo de IMO -Actividad locomotora espontánea: no se encontraron cambios significativos entre los grupos experimentales
Ates et al., 2014	Ratas Wistar macho, adultas n=10 por grupo	DM1: STZ 45 mg/kg, i.p. Única dosis	-Campo abierto -EPM -Nado forzado	-Las pruebas conductuales se realizaron 4 semanas después de la inyección con STZ	-Los animales tratados con STZ mostraron un ↑ en los niveles basales de CORT, y una ↓ en los niveles plasmáticos de leptina y en la expresión de los niveles del receptor de leptina en la corteza prefrontal. También se reporta también un ↑ de neuronas apoptóticas en dicha región cerebral. -Los animales tratados con STZ mostraron los siguientes cambios conductuales: -EPM: ↓ el de tiempo en los brazos abiertos del laberinto y un ↑ en el tiempo en los brazos cerrados del aparato -Campo abierto: ↓ tiempo en los brazos centrales de la arena y un ↑ en la locomoción horizontal -Nado forzado: ↑ tiempo de IMO

**Abreviaturas:** CORT: corticosterona; DM1: diabetes mellitus; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilidad; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Stefannello et al., 2014	Ratas Wistas macho, adultas 220-300g n=5-10 por grupo	DM1: STZ 60 mg/kg, i.p. Única dosis	-Prueba de evasión inhibitora -Campo abierto -EPM	-Los animales inyectados con STZ se sometieron a un tratamiento con ácido clorogénico (AC, 5mg/kg), cafeína (CA 15 mg/kg) y café (CF, 0.5 g/kg)	-Los animales tratados con STZ mostraron los siguientes cambios conductuales: -Prueba de evasión inhibitora: ↓ la latencia para descender de la plataforma electrificada, indicando una reducción de la memoria. El tratamiento con AC previno la pérdida de memoria en los animales tratados con STZ. -Campo abierto: no se encontraron cambios significativos en la locomoción registrada en ninguno de los grupos experimentales -EPM: ↓ el porcentaje de tiempo en los brazos abiertos del laberinto, acompañado de un ↑ en el porcentaje de tiempo en los brazos cerrados del aparato. El tratamiento con el AC tuvo un efecto ansiolítico en los animales tratados con STZ. -El tratamiento con CA y CF tuvo un efecto ansiogénico en los animales control.
Garabadu y Krishnamurthy, 2014	Ratas Charles Foster macho, adultas 200-250 g n=6 por grupo	DM2: Nicotinamida (110 mg/kg, ip., 15 min. Previos a la administración de STZ) + STZ (45 mg/kg, i.p.)	-EPM, previa exposición a un paradigma de estrés por frío	-5 grupos experimentales distintos: CONT, STZ, STZ+Diazepam (1 mg/kg, i.p.), STZ+Metformina (25 mg/kg, p.o.) y STZ+ Diazepam y Metformina - Se realizaron pruebas de estrés oxidativo en distintas regiones cerebrales (hipocampo, hipotálamo, estriado, núcleo accumbens amígdala y corteza prefrontal)	-Los animales tratados con STZ manifestaron un perfil ansiogénico en el EPM en comparación con el grupo control. El tratamiento con Diazepam y Metformina produjeron efectos ansiolíticos. -La monoterapia con Diazepam o con Metformina produjo un mejor desempeño en los individuos diabéticos que fueron sometidos a pruebas de tolerancia a la glucosa y de sensibilidad a la insulina. Además, redujeron los niveles de hiperglucemia en los animales tratados con STZ, así como los niveles de triglicéridos, colesterol, resistencia a la insulina y CORT. - Todos los parámetros (metabólicos y conductuales) tuvieron mejores efectos con la terapia combinada (Diazepam+Metformina), en comparación con los regímenes de monoterapia. -Los marcadores de estrés oxidativo en las regiones cerebrales estudiadas se redujeron de forma significativa con el tratamiento del Diazepam+Metformina. -La terapia combinada también produjo la reducción significativa de la formación de úlceras gástricas en los animales tratados con STZ, en comparación con la monoterapia.

**Abreviaturas:** CORT: corticosteroona; DM1: diabetes mellitus; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilidad; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.

REFERENCIA	TIPO DE CEPA Y CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES	MODELO DE DM	PRUEBA CONDUCTUAL	OBSERVACIONES	RESULTADOS
Rebolledo-Solleiro 2014 (este trabajo)	Ratas Wistar macho 250-280g n=24	DM1: STZ 100 mg/kg, dividida en dos dosis consecutivas de 50 mg/kg, i.p.	-Enterramiento defensivo	-Se administró en los animales tratados con STZ un antagonista selectivo de los receptores tipo D1(SCH23390, en una dosis de 100 ng/lado) a través de cánulas intra-amigdalinas, bilaterales -Las pruebas conductuales se realizaron 10 días después de la inyección con STZ	-Los animales tratados con STZ mostraron un ↑ en el tiempo que el animal pasaba realizando conductas de congelamiento en la prueba de enterramiento defensivo. - El efecto anterior en los animales tratados con STZ fue revertido con la administración bilateral, intra-amigdalina del SCH23390, i.e., ↓ el tiempo de congelamiento.
Rebolledo-Solleiro 2014 (este trabajo)	Ratas Wistar macho sometidas a una dieta rica en carbohidratos (solución de sacarosa al 20%) 250-280 g n=25	DM2/SM: las ratas muestran obesidad central, hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensión y prueba de tolerancia a la glucosa alterada	-EPM -Campo abierto -Enterramiento defensivo	-Las pruebas conductuales se realizaron 6 meses posteriores al inicio del tratamiento con la solución de sacarosa al 20%	-EPM: no se detectaron cambios significativos entre el grupo control y el tratado con la solución de sacarosa. -Campo abierto: los animales tratados con la solución de sacarosa mostraron un perfil ansiogénico, caracterizado por un ↑ en el tiempo que el animal pasaba realizando conductas de congelamiento y una ↓ en el tiempo que exploraba los cuadros centrales de la arena. -Enterramiento defensivo: los animales tratados con la solución de sacarosa mostraron un perfil ansiogénico, caracterizado por un ↑ en el porcentaje de tiempo que el animal pasaba realizando conductas de enterramiento.

**Abreviaturas:** CORT: corticosterona; DM1: diabetes mellitus; DM2: diabetes mellitus tipo 2; EPM: laberinto elevado en forma de "+"; IMO: inmovilidad; SM: Síndrome Metabólico; STZ: estreptozotocina; ↑: aumento; ↓: disminución.



## Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test



Daniela Rebolledo-Solleiro<sup>a</sup>, Minerva Crespo-Ramírez<sup>a</sup>, Gabriel Roldán-Roldán<sup>b</sup>,  
Marcia Hiriart<sup>a</sup>, Miguel Pérez de la Mora<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Division of Neuroscience, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Neurobiología de la Conducta, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

### HIGHLIGHTS

- Thirsty rats show an anxiolytic-like behavior in the elevated plus-maze.
- Streptozotocin-treated rats show an anxiolytic profile in the elevated plus-maze.
- Elevated plus-maze studies in thirsty rats may be misleading.
- Walls in the elevated plus-maze form visual barriers which affect their results.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 July 2012

Received in revised form 9 April 2013

Accepted 3 August 2013

Available online 12 August 2013

#### Keywords:

Streptozotocin

Elevated plus-maze

Open-field test

Water deprivation

Rats

Anxiety

### ABSTRACT

Conflicting results have been obtained by several groups when studying the effects of streptozotocin (STZ)-treated rats in the elevated plus-maze (EPM). Since thirst is a prominent feature in STZ-induced diabetic-like condition, we studied whether the walls of the closed arms of the EPM, by limiting the search for water in the environment, may contribute to the observed differential behavioral outcomes. The aim of this study was to ascertain whether visual barriers within the EPM have an influence on the behavior of STZ-treated rats in this test of anxiety. A striking similarity between STZ-treated (50 mg/kg, i.p., in two consecutive days) and water deprived rats (72 h) was found in exploratory behavior in the EPM, showing an anxiolytic-like profile. However the anxiolytic response of STZ-treated rats exposed to the EPM shifts into an anxiogenic profile when they are subsequently tested in the open-field test, which unlike the EPM is devoid of visual barriers. Likewise, water deprived rats (72 h) also showed an anxiogenic profile when they were exposed to the open-field test. Our results indicate that experimental outcomes based on EPM observations can be misleading when studying physiological or pathological conditions, e.g. diabetes, in which thirst may increase exploratory behavior.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

There is strong evidence that type-1 diabetes mellitus increases the risk for affective and anxiety disorders. Using a meta-analytical approximation, Anderson and colleagues [1] provided evidence for an association between anxiety disorders and hyperglycemia in diabetic patients. In the last decade, it has also been established that the prevalence of anxiety disorders (generalized anxiety disorder, agoraphobia, social phobia, and post-traumatic stress disorder) in diabetic patients is higher than in the general population [2–5], supporting the idea that there exists a relationship between diabetes and anxiety.

One of the most used and well characterized methods to induce a diabetic-like condition in rodents is the administration of streptozotocin (STZ), which results in the destruction of pancreatic  $\beta$ - cells [6,7]. STZ-treated rats exhibit hypoinsulinemia [6,8,9], hyperglycemia, glycosuria, polyuria [6], polyphagia and polydipsia [4], among other symptoms that characterize type 1 diabetes mellitus in humans. A marked loss of body weight is also observed in these animals [6,9,11].

Furthermore, it has been demonstrated that STZ-treated rats display increased anxiety-like behavior in different paradigms, such as the social interaction test, the open-field test, the zero maze, [12] and the hole-board test [13]. However, when the behavior of STZ-treated rats was studied in the elevated plus maze (EPM) – an unconditioned animal model extensively used in anxiety research [14–16] – anxiogenic [12], anxiolytic [17] or unaltered profiles [18] were found.

Interestingly, a similar behavioral outcome seemingly occurred when the emotional profile of water-deprived rats was studied in

\* Corresponding author at: Apartado Postal 70-253, México DF 04510, Mexico. Tel.: +52 55 56225659; fax: +52 55 55500064.

E-mail address: [mperez@ifc.unam.mx](mailto:mperez@ifc.unam.mx) (M. Pérez de la Mora).



different tests of anxiety since whereas anxiogenic-like behavior was displayed in the shock-probe burying test [19], an anxiolytic response was observed in the EPM [20].

Since polydipsia is a physiological condition which signals thirst, and the walls of the closed arms of EPM represent visual barriers which limit the sight of the maze environs including its open arms [14,21], we wondered whether thirst may drive STZ-treated animals to explore its open arms looking for water, thereby given a misleading idea of their affective state. The present work was aimed to study this possibility.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

142 adult male Wistar rats (250–300 g) bred in the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, were used. Rats were housed in a controlled environment (temperature = 22 °C, lights on at 06:00–18:00 h) in groups of 4 or 5 animals per cage with food (Purina chows) and water ad libitum, with the exception of those animals that were used for the water deprivation experiments (see below). The experiments were conducted according to the guidelines established by the local Mexican Ethics Committee according to the “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”, Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010. Efforts were taken to minimize animals' suffering throughout all experimental procedures.

### 2.2. Streptozotocin treatment

Streptozotocin (STZ) was administrated at a dose of 100 mg/kg (diluted in a 90 mM citrate buffer, pH 4.8) injected on two consecutive days (50 mg/kg, i.p., each day) as described by Vilchis and Salceda [22]. Non-diabetic rats received vehicle only. Since under these conditions blood glucose levels were significantly increased in 96% of the animals 5 days after treatment, the behavioral evaluations in the EPM were made either 5 or 10 days after STZ treatment (STZ-5 and STZ-10 groups, respectively). Blood glucose levels were measured in non-fasted rats with the aid of a glucometer (Accu-Chek). Hyperglycemia was considered when blood glucose levels were above 300 mg/ml. Body weight was registered both before STZ treatment and after behavioral testing.

### 2.3. Water deprivation

Based on the reports by Saldívar-González et al. [19] and McBlane and Handley [20], rats were deprived of water for 48 and 72 h prior testing either in the EPM or the open-field test. Water-deprived groups had free access to food throughout the experiment and water was given to them immediately after the end of the experiment. Rats from the control group received water and food ad libitum.

### 2.4. Behavioral procedures

Animals were handled for 5 min once a day for 3 or 4 consecutive days. Rats were kept overnight in the experimental room in order to avoid context influences and to keep their basal anxiety levels as low as possible. Behavioral experiments were conducted between 10:00 and 16:00 h in a sound-attenuated room equipped with video-recording facilities. The devices used for the evaluation of behavior were placed beneath the video camera, and behavior was recorded in the absence of any observer. In all the experiments, rats were assigned to each group and tested in a randomized manner. Each animal was used only once.

#### 2.4.1. Elevated plus-maze

The maze used in this work was based essentially on the design of Pellow et al. [14] and was constructed as previously described [21]. It

consisted of two open arms (50 × 10 cm) and two enclosed arms (50 × 10 × 40 cm) with an open roof. The arms intersected at the central square (10 × 10 cm). The maze was elevated 50 cm from the floor by a pedestal joined to the central square. In order to avoid rats falling from the maze, wooden sledges (0.5 × 0.5 cm) were attached along the edges of the open arms. Rats were placed on the central square of the maze facing an open arm at the beginning of the test, and were allowed to explore the maze for 5 min. The number of entries to the open arms (expressed as the percentage of the total number of arm entries) and the total time spent in these arms of the maze were taken as an anxiety index (the higher the index, the lower the anxiety). The total number of arms (open + closed) entries was taken as a measure of locomotion [14,21]. An entry was counted when the four paws of the rat were placed in the respective arm. The maze was cleaned with detergent and dried before each trial. The illumination level at the central square of the maze was 5.1 lx during testing.

#### 2.4.2. Open-field test

Since time spent in the center of the open field is considered a measure related to anxiety [23], in order to further analyze this behavior, STZ-treated rats were placed in an open field immediately after being evaluated in the EPM. Anxiety-like behavior and locomotion were also studied in naive rats that were deprived from water for either 48 or 72 h. Evaluations were carried out in an arena (50 × 50 × 30 cm) divided into 25 squares (10 × 10 cm) as previously described [21]. Each rat was placed in the center of the arena and was allowed to explore it for either 5 or 10 min. The time spent in the central squares of the arena was quantified, as well as the time that the rat spent in freezing behavior. Freezing behavior was defined as the absence of any movement of the rat with the exception of those needed for breathing. For measuring locomotion photoelectric-cells were used to record the horizontal movements of the animals through the arena (OMNIALVA, Mexico City, Mexico). Each wall contained 10 photoelectric cells separated by 5 cm from each other that were located 4.0 cm above the arena. The box was interfaced with a PC that allowed estimating quantitatively the number of beam interruptions through the photocells during the locomotion of the animal in the arena and transforming them into arbitrary locomotion events with a sample frequency of 10 Hz. Light intensity at the center of the arena was 138 lx.

#### 2.4.3. Water consumption test

Experiments were carried out in an acrylic box (47 × 32 × 20 cm) equipped with a 25 ml pipette mounted on the top of the box. The tip of each pipette was positioned 10 cm above the floor. Water restricted (control, 48 and 72 h) rats and STZ-treated animals (vehicle, STZ-5 and STZ-10) were placed individually in this apparatus after open field testing in order to quantify their consumption of water for 10 min.

#### 2.4.4. Statistical analysis

All data are expressed as means ± SEM. Normal distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. One-way ANOVA followed by Dunnett's or Tukey's post-hoc tests when required were used for comparisons between groups under the same experimental condition (water deprivation or STZ-treatment). Significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical parameters were computed using GraphPad Prism 5 statistical software.

## 3. Results

### 3.1. Body weight

Water deprivation for either 48 or 72 h before testing in the EPM resulted in a significant body weight reduction of 11% and 21%, respectively, as compared with their initial body weight (the initial body weight for each group was: control rats:  $273 \pm 6.8$ ; 48 h:  $294 \pm 5.4$ ; 72 h:  $291 \pm 6.1$ ). Control rats showed a 12.5% body

**Table 1**  
Body weight and blood glucose levels measured in either water deprived or streptozotocin-treated rats.

Experimental condition		Body weight difference (g)	Blood glucose levels (mg/dl)	Size sample
Water deprivation	Control	(+) 28.1 ± 3.2	nd	22
	48 h	(-) 32.9 ± 3 <sup>a</sup>	nd	15
	72 h	(-) 48.3 ± 8.4 <sup>a</sup>	nd	16
Streptozotocin-treatment	Vehicle	(+) 55.8 ± 1.6	133 ± 5	22
	STZ-5	(-) 18.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	524 ± 23 <sup>c</sup>	22
	STZ-10	(-) 25.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	534 ± 14 <sup>c</sup>	22

nd: not determined.

<sup>a</sup> Control vs. 48 h and 72 h body weight difference (One-way ANOVA, post-hoc Dunnett,  $p < 0.001$ ).

<sup>b</sup> Vehicle vs. STZ-5 and STZ-10 body weight difference (One-way ANOVA, post-hoc Dunnett,  $p < 0.001$ ).

<sup>c</sup> Vehicle vs. STZ-5 and STZ-10 blood glucose levels (One-way ANOVA, post-hoc Dunnett,  $p < 0.001$ ).

weight gain through all the experiment (72 h) (Table 1). Similar body weight changes were observed in those rats that were deprived from water and immediately tested in the open-field (data not shown). STZ-treated rats showed a significant reduction in their body weight both at 5 (7%) and 10 (11%) ( $F_{(2, 63)} = 70$ ,  $P < 0.0001$ ) days after the beginning of the STZ treatment (the initial body weight for each group was: vehicle-treated rats:  $260 \pm 6.8$ ; STZ-5:  $273 \pm 4.1$ ; STZ-10:  $262 \pm 4.6$ ). In contrast, vehicle-treated rats gained a 21.5% of their initial body weight throughout the 10 days of the experiment (Table 1).

### 3.2. Blood glucose levels

STZ-treated animals showed a significant increase ( $F_{(2, 63)} = 194$ ,  $P < 0.0001$ ) in blood glucose levels as compared with the vehicle-treated group (Table 1). No hyperglycemia was found 3 days after a single dose of 50 mg/kg STZ (results not shown).

### 3.3. Effects of either water deprivation or STZ-treatment on water consumption

As shown in Fig. 1a, water consumption was significantly increased following 48 and 72 h of water deprivation ( $F_{(2, 35)} = 128$ ;  $P < 0.0001$ ) as compared to the controls. The same effect was observed in the STZ-treated rats ( $F_{(2, 28)} = 113$ ;  $P < 0.0001$ ) even though this effect was only observed 10 days after STZ treatment (Fig. 1b). Although no systematic measurements were carried out, it was notable from the bedding material that the STZ-treated rats urinated more than the vehicle-control group.

### 3.4. Effects of either water deprivation or STZ-treatment on the behavior of rats in the elevated plus-maze

As depicted in Fig. 2, both water deprivation and STZ treatment enhanced the exploration of the open arms of the maze. Water-deprived rats showed an increase in the time they spent in the open arms of the EPM ( $F_{(2, 50)} = 11$ ,  $P < 0.001$ ) reaching statistical significance only in the 72 h water deprived group, as compared to the other groups (against control,  $P < 0.001$ ; against 48 h water deprived group;  $P < 0.01$ ) (Fig. 2a). A similar effect was found in the percentage of entries into the open arms of the maze ( $F_{(2, 50)} = 28$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2b). Likewise, 10 days after STZ-treatment, rats spent more time in the open arms of the maze ( $F_{(2, 63)} = 4.3$ ,  $P < 0.01$ ) when compared to the vehicle-treated group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2d). Consistent with these results an increase in the percentage of entries into the open arms of the maze was observed after treatment with STZ ( $F_{(2, 63)} = 7.9$ ,  $P < 0.01$ ) which accounted for the difference between the STZ-10 group and both the vehicle-injected and the STZ-5 groups ( $P < 0.01$ , Fig. 2e). No effects were observed in the total number of entries into the open + closed arms of the EPM both in water deprived ( $F_{(2, 50)} = 0.76$ ,  $P = 0.47$ ) (Fig. 2c) and STZ-treated ( $F_{(2, 63)} = 2.8$ ,  $P = 0.07$ ) (Fig. 2f) rats.

### 3.5. Effects of STZ-treatment on the behavior of rats in the open field test as measured immediately to their exposure to the EPM

As shown in Fig. 3 when the anxiety-like behavior was measured in the open-field test immediately after its evaluation in EPM a significant reduction ( $F_{(2, 63)} = 5.3$ ,  $P < 0.05$ ) in the time spent in the central squares of the arena by the STZ-10 treated rats was observed. Likewise, an increase in freezing behavior did also occur ( $F_{(2, 63)} = 9.9$ ,  $P < 0.0001$ ) in the same group of STZ-treated rats in this test.

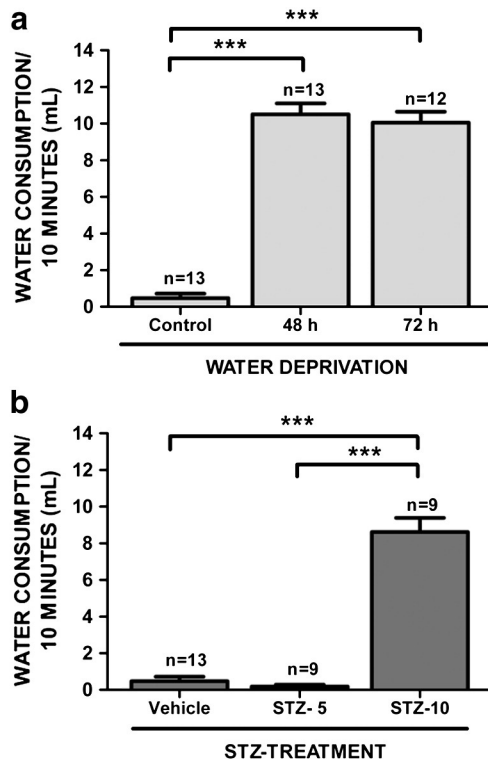
### 3.6. Effects of water deprivation on the behavior of rats in the open field test

As indicated in Fig. 4 water deprivation induced a time-dependent increase in freezing behavior which reached statistical significance after 72 h ( $F_{(2, 20)} = 4$ ,  $P < 0.05$ ). Furthermore, such a freezing behavior even limited the locomotion of the rats within the arena ( $F_{(2, 20)} = 9.226$ ,  $P < 0.001$ ). In contrast, no statistical significant changes were found on the time spent by the rats in the central squares of the open field ( $F_{(2, 20)} = 0.44$ ,  $P > 0.05$ ).

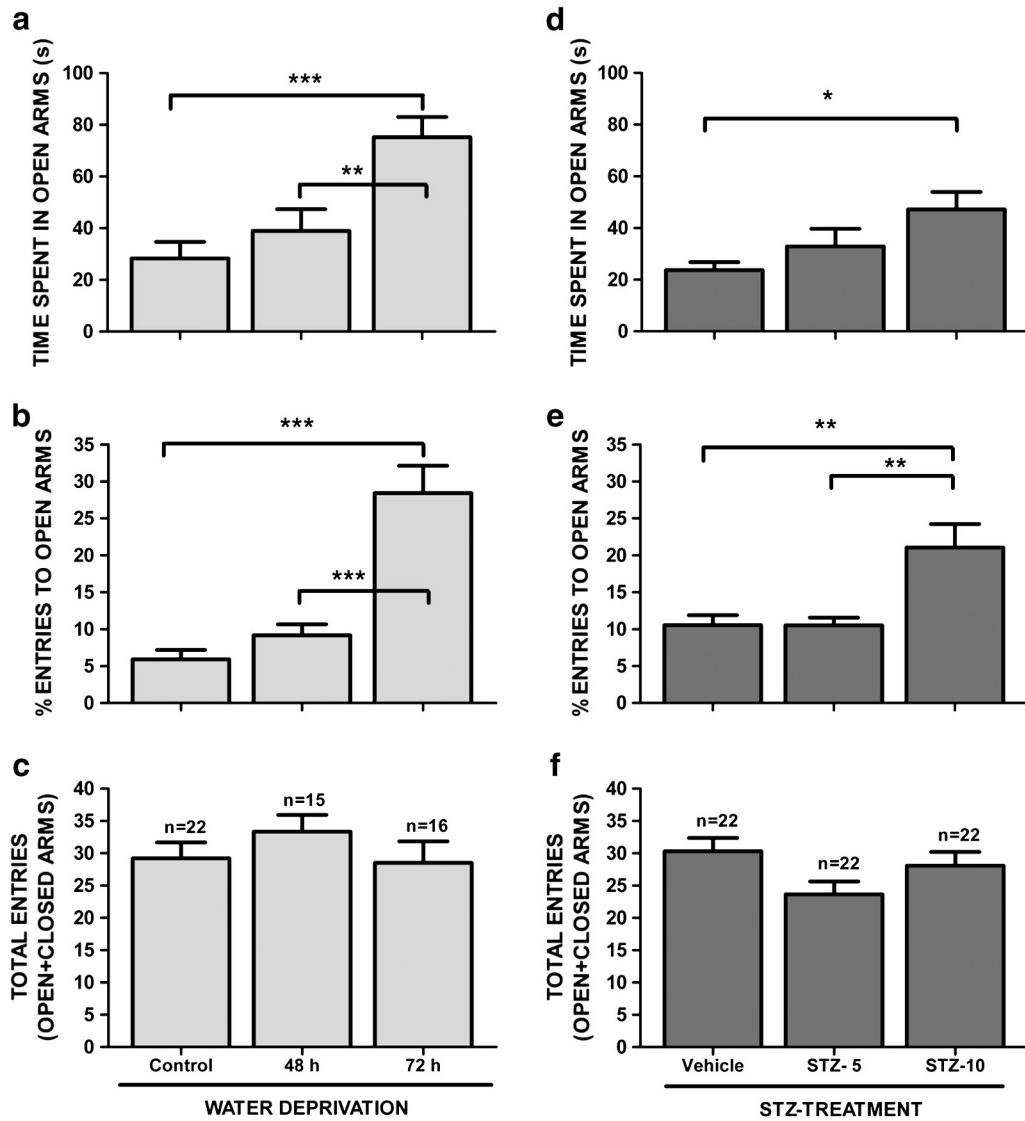
## 4. Discussion

The STZ-induced diabetes model has been widely used as an animal model of type 1 diabetes mellitus because STZ destroys pancreatic  $\beta$ -cells, generating severe hyperglycemia in experimental subjects [6,7]. Our results provided evidence of the hyperglycemic condition, body weight loss, polydipsia and polyuria indicating that rats studied in our experiments had, as reported by other authors [6,9–11], alterations observed in type 1 diabetes.

The main finding of this work was the striking similarity between STZ-treated and water-deprived rats observed in exploratory behavior



**Fig. 1.** Water consumption was significantly increased (a) following 48 or 72 h of water deprivation and (b) 10 days after STZ treatment. Bars represent mean  $\pm$  SEM. Numbers above bars indicate sample size. \*\*\*  $P < 0.0001$ , Tukey test.

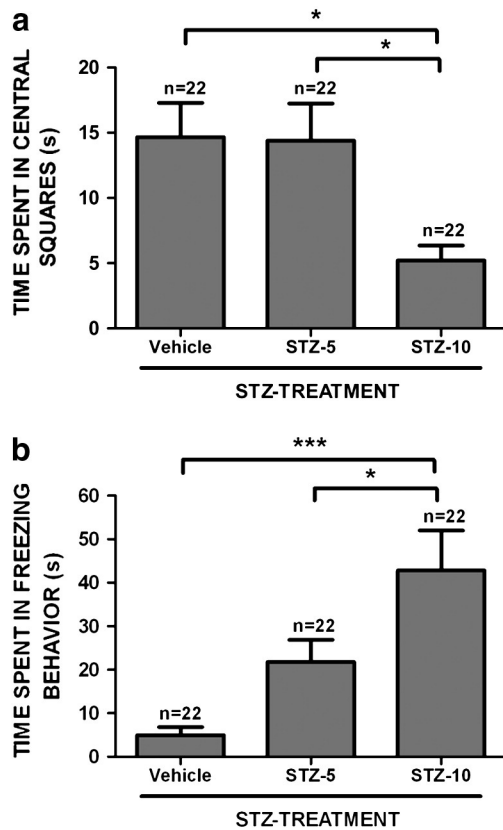


**Fig. 2.** Effect of either water deprivation or STZ-treatment on anxiety-like behavior in the elevated plus-maze. Both water deprivation (a, b) and STZ-treatment (d, e) enhanced the time spent in (a, d) and the number of entries into (b, e) the open arms of the maze. No effects were observed on the total number of entries into the open + closed arms of the maze (c, f) under the two experimental conditions. Bars represent mean  $\pm$  SEM. Numbers above bars indicate sample size. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ , Tukey test.

in the EPM. Thus, STZ-treated and water deprived rats showed an increased number of entries into the open arms of the maze and spent more time in these arms compared to their respective control groups, suggesting that anxiolytic effects were elicited in both experimental conditions. Furthermore, a shift from an anxiolytic to an anxiogenic profile was observed when the behavior of STZ-treated rats was evaluated in the EPM and subsequently tested in the open field test. It is, however, unlikely that changes in locomotion account for these results, since no effects were observed in the total number of entries into the arms of the EPM (open + closed), which is considered as an in-built measure of locomotion in this paradigm [14].

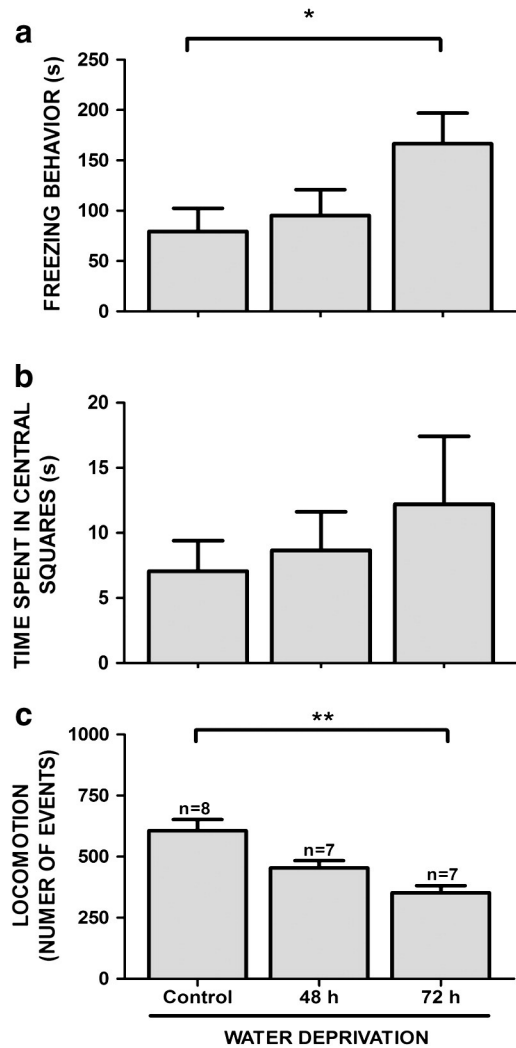
Our observations carried out in water deprived rats are in line with the study of Mc Blane and Handley [20] who found that water deprived rats (24–48 h) spent more time exploring the open arms of the EPM, suggesting that they display an anxiolytic profile as compared with non-deprived controls. In line with the above, our results also show that water deprived rats exhibit an anxiogenic-like profile in the open field test, which unlike EPM lacks visual barriers. Such a profile was characterized by an increased freezing behavior which because of its severity even limited the locomotion of rats in this test. These results however differed from the behavioral pattern observed in the open

field model after the exposition of our STZ-treated rats to the EPM which showed avoidance for the central part of the open field rather than an increase in freezing behavior. The reason for this difference is unknown but it may reflect the influence of the previous experience of rats in the EPM on their coping behavior making them change their options from an active (moving from the central into the peripheral part of the open field) to a passive (immobility) coping behavior. In agreement with the above Saldívar-González et al. [19] reported that water deprived rats (72 h) displayed an anxiogenic-like profile in the shock/probe burying test which is also devoid of visual barriers but that it may be more anxiogenic than the open field test due to the presence of a continuously electrified probe within the space explored by animal in this test. In view of the above it is important to consider that since water consumption was found increased in STZ-treated rats as well as in water deprived rats, thirst is indeed a common feature in both experimental conditions and may have an important role in the behavior of animals in the EPM and perhaps in other tests of anxiety. In line with these results, it is worth mentioning that in the work of Hilakivi-Clarke and coworkers [18] an increase in water consumption and urination was observed in mice.



**Fig. 3.** Effect of STZ-treatment on anxiety-like behavior in the open field test as measured immediately after animals' exposure to the EPM. (a) STZ-10 group showed a reduction in the time spent in central squares and (b) enhancement in the time spent in freezing behavior as compared with the vehicle and the STZ-5 group. Bars represent mean  $\pm$  SEM. Numbers above bars indicate sample size. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ , Tukey test.

Our STZ results differ from those of Ramanathan et al. [12] who reported in rats an anxiogenic-like profile in the EPM and from those of Jung et al. [24] and Ho and collaborators [25], who observed in mice either anxiogenic effects in the EPM or no effects in the elevated-zero maze, respectively. In support of our results a clear anxiolytic tendency was however observed in the EPM in mice by Hilakivi-Clarke et al. [18] 10 days after the treatment with STZ. The reasons for these discrepancies are at present unclear and although they might be explained, at least partially, on the basis of the different experimental conditions used in each work i.e. species (rat in Ramanathan et al. [12] and ours vs. mouse in Hilakivi-Clarke et al. [18], Ho et al. [25] and Jung et al. [24] works), strain tested (Charles Foster in Ramanathan et al. [12] work vs. Wistar rats in this study) or sex (male + female in Ramanathan et al. [12] experiments), they may rather reflect differences in the protocols used in these studies and their impact on the induction of thirst. Hence, whereas Ramanathan and colleagues [12] treated rats with a single 50 mg/kg STZ dose, in this work STZ was given in two daily (50 mg/kg) consecutive administrations. Moreover, anxiety-like behavior was evaluated in the EPM 3 days after STZ treatment in the study of Ramanathan and collaborators while longer time intervals were used in this work (5 and 10 days). Thus, although water intake was not measured by Ramanathan et al. [12] the results of this work showing that polydipsia was not present at 5 days but developed until 10 days after treatment, suggests that rats in the work of Ramanathan and colleagues were not as thirsty as ours at the moment of their behavioral testing. On the other hand, since mice are more resistant than rats to the diabetogenic effects of STZ [26] it may be feasible that mice in the study of Jung and coworkers [24] had been less thirsty than both our rats and the mice of Hilakivi-Clarke et al. [18] and Ho et al. [25]. Accordingly, a similar STZ



**Fig. 4.** Effect of water deprivation on anxiety-like behavior in the open field test. A time-dependent increase on freezing behavior (a) which was significant after 72 h was found, whereas no effect was observed on the time spent by the rats in the central squares of the open field (b). A significant reduction on locomotion was observed following 72 h of water deprivation (c). Bars represent mean  $\pm$  SEM. Numbers above bars indicate sample size. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ , Tukey test.

dose than the one used in this work (100 mg/kg), and a half of the dose administered by the two latter groups was used in the study of Jung and collaborators [24]. Furthermore, the continuous spatial disposition of the open and closed quadrants in the elevated-zero maze used by Ho et al. [25], which offers less visual barriers to animals than EPM, may have also been involved in the decreased motivation of their STZ-treated rodents to explore the open arms of their maze in contrast to the increased exploration of these arms in the EPM found in this work, and also reported in mice by Hilakivi-Clarke [18].

In view of the above considerations, it is possible that thirsty rats (water deprived or STZ-treated), may display an increased motivation and an enhanced drive to explore the open arms of EPM in their search for water. Thus, under these conditions, the exacerbated thirst experienced by these animals and the lack of visibility produced by the walls of the enclosed arms, may overcome the innate threatening situation represented by the open arms of the maze, leading to a false interpretation of the animals' behavior in this paradigm. This situation can be compared with the outcome in the Vogel's anxiety test, in which in spite of an impending electric shock thirsty naive rats approach the electrified spout of this test and drink water [27].

## 5. Conclusions

The results of this study indicate that the experimental outcomes in anxiety-like behavior based on EPM observations can be misleading when studying physiological or pathological conditions, such as water intake mechanisms or diabetic syndromes, in which thirst may play a major role.

## Acknowledgments

This study was supported in part by the grants IN200508 and IN203111 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. We also thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the support of this work through grant no. 207084. This study was partially supported by a CONACyT graduate fellowship to D.R-S within the program of Doctorado en Ciencias Biomédicas from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors thank Dr. Robyn Hudson for the valuable comments to the manuscript. The assistance of Javier Rebolledo-Serrano in conducting these experiments is fully appreciated. We are also indebted to the Computing Unit of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and in particular to Francisco Pérez-Eugenio for his help during this work.

## References

- [1] Anderson RJ, Grisby A, Freedland KE, de Groot M, McGill JB, Clouse RE. Anxiety and poor glycemic control: a meta-analytic review of literature. *Int J Psychiatry Med* 2002;32(3):235–47.
- [2] Kruse J, Scmitz N, Thefeld W. On the association between diabetes and mental disorders in a community sample: results from the German National Health Interview and Examination Survey. *Diabetes Care* 2003;26(6):1841–6.
- [3] Clavijo M, Carvalho JJ, Rios M, Ries de Oliveira I. Psychiatric disorders in patients with diabetes type 2 at medical care and training district of Rio Branco-Acre, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64(3-B):807–13.
- [4] Lin EH, Korff MV. Mental disorders among persons with diabetes: results from the World Mental Health Surveys. *J Psychosom Res* 2008;65(6):571–80.
- [5] Herzer M, Hood KK. Anxiety symptoms in adolescents with type 1 diabetes: association with blood glucose monitoring and glycemic control. *J Pediatr Psychol* 2010;35(4):415–25.
- [6] Junod A, Lambert AE, Stauffacher, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969;48:2129–39.
- [7] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:536–46.
- [8] Havel PJ, Uriu-Hare JY, Stanhope KL, Sterns JS, Keen CI, Ahrén B. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am J Physiol* 1998;274:1482–91.
- [9] Jöhren O, Gremmels JA, Qadri F, Dendorfer A, Dominiak P. Adrenal expression of orexin receptor subtypes is differentially regulated in experimental streptozotocin induced type-1 diabetes. *Peptides* 2006;27:2764–9.
- [10] Bellush LL, Reid SG. Metabolic and neurochemical profiles in insulin-treated diabetic rats. *Am J Physiol* 1994;266:87–94.
- [11] Barber M, Kasturi BS, Austin ME, Patel KP, Mohan Kumar SM. Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Res* 2003;21(1):128–35.
- [12] Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattachayra SK. Differential effects of diazepam on anxiety in streptozotocin induced diabetic and non-diabetic rats. *Psychopharmacology* 1998;135:361–7.
- [13] Kamei K, Ahsawa M, Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Modification of the effects of benzodiazepines on the exploratory behaviors of mice on a hole-board by diabetes. *Jpn J Pharmacol* 2001;86:47–54.
- [14] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67.
- [15] Rodgers RJ. Animal models of anxiety: where next? *Behav Pharmacol* 1997;8:477–96.
- [16] Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defense and the elevated-plus maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:801–10.
- [17] Rebolledo-Solleiro D, Hiriart-Urdanivia M, Roldán-Roldán G, Pérez de la Mora M. Comparison of anxious-like behavior in rats rendered diabetic using both type-1 and type-II diabetes models in two anxiety paradigms. Society for Neurosciences' Annual Meeting Abstracts, San Diego, CA; 2010.
- [18] Hilakivi-Clarke LA, Wozniak KM, Durcan MJ, Linnoila M. Behavior of streptozotocin-diabetic mice in test of exploration, locomotion, anxiety, depression and aggression. *Physiol Behav* 1990;48:429–33.
- [19] Saldívar-González JA, Hernández León MJ, Mondragón Ceballos R. Enforced water drinking induces changes in burying behavior and social interaction test in rats. *Physiol Behav* 1996;60(3):823–7.
- [20] Mc Blane JW, Handley SL. Effects of two stressors on behavior in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology* 1994;116(2):173–82.
- [21] Pérez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramírez M, Marcellino D, Chansson AC, Fuxe K. Distribution of dopamine D2-like receptors in the rat amygdale and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. *Neuroscience* 2012;201:252–66.
- [22] Vilchis C, Salceda R. Effect of diabetes on levels and uptake of putative amino acid neurotransmitters in rat retina and retinal pigment epithelium. *Neurochem Res* 1996;21:1167–71.
- [23] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
- [24] Ho N, Balu DT, Hilario M, Blendy JA, Lucki I. Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol Behav* 2012;105:702–8.
- [25] Jung SW, Han O, Kim S. Increased expression of  $\beta$  amyloid precursor gene in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice with memory deficit and anxiety induction. *J Neural Transm* 2010;117:1411–8.
- [26] Yang H, Wright JR. Human  $\beta$  cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo. *Endocrinology* 2002;143:2491–5.
- [27] Vogel JR, Beer B, Clody DE. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents. *Psychopharmacology* 1971;21:1–7.

## **“Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in rats”**

Daniela Rebolledo-Solleiro<sup>a</sup>, Gabriel Roldán-Roldán<sup>b</sup>, Daniel Díaz<sup>d</sup>, Velasco M<sup>a</sup>,  
Larqué C<sup>a</sup>, Guadalupe Rico-Rosillo<sup>c</sup>, Gloria Bertha Vega-Robledo<sup>c</sup>, Marcia  
Hiriart<sup>a\*</sup>, Miguel Pérez de la Mor<sup>a\*</sup>.

**Keywords:** anxiety, metabolic syndrome, leptin, elevated-plus maze, open field test, burying test, rats

<sup>a</sup> Division of Neuroscience, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.

<sup>b</sup> Laboratorio de Neurobiología de la Conducta, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.

<sup>c</sup> Laboratorio de Inmunología, Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City.

<sup>d</sup> Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México, México City.

\*Corresponding authors:

Miguel Pérez de la Mora

E-mail address: mperez@ifc.unam.mx

Address: Apartado Postal 70-253, México DF 04510, Mexico. Tel: +52 55 56225659;

fax: +52 55 55500064

Marcia Hiriart

E-mail address: mhiriart@ifc.unam.mx

Address: Apartado Postal 70-253, México DF 04510, Mexico. Tel: +52 55 56225607;

fax: +52 55 55500064

## **Abstract**

Metabolic syndrome (MS) can be defined as a cluster of signs that increases the risk to develop diabetes mellitus type 2 and cardiovascular diseases. In the last years a growing interest to study the relationship between MS and psychiatric disorders, such as depression and anxiety, has emerged, obtaining conflicting results. Most of the experimental approximations to study this association have been done using transgenic mice. Diet-induced models for MS have only examined the effects of high-fat diets. Hence, the present work was designed to ascertain whether anxiety-like behavior was associated with MS in rats chronically submitted to a high-carbohydrate diet (20% sucrose in drinking water) using three different anxiety paradigms: the Elevated-Plus Maze (EPM), the Open Field Test (OFT) and the Shock-Probe/Burying Test (SPBT). Sucrose-treated rats showed signs of a MS-like condition: a significant increase in body weight and body mass index, abdominal obesity, hypertension, hyperglycemia, hyperinsulinemia and dyslipidaemia. Plasma leptin and resistin levels were also increased. Behaviorally, the sucrose-treated group showed both avoidance to explore the central part of the arena and a significant increase in freezing behavior in the OFT. In addition, these animals displayed an increase in burying behavior in the SPBT, and show a tendency to reduce the exploration of the open arms of the EPM. These results indicate that rats under a 24-week high sucrose treatment develop a metabolic syndrome associated to an anxiety-like behavior. Although the mechanisms responsible for these behavioral outcomes remain to be investigated the role of leptin is emphasized.

## Introduction

Metabolic syndrome (MS) may be defined as a cluster of signs that increases the risk to develop diabetes mellitus type 2 (DM2) and cardiovascular diseases. The cardinal signs are abdominal obesity, elevated blood pressure, dyslipidemia, hyperinsulinemia together with insulin resistance, impaired fasting glucose levels and impaired glucose tolerance [1].

In the last years there has been a growing interest to study the relationship between MS and psychiatric disorders, such as depression and anxiety. However, the results obtained so far have been rather contradictory. In 2009 Carroll and colleagues [2] showed evidence for a positive association between General Anxiety Disorder (GAD) and MS within a large population of male US veterans from the Vietnam War. In contrast, Hildrum et al. [3] did not find such an association between anxiety and MS in a Norwegian cohort. Two years later, in 2011, Linville and collaborators [4] stated that the overall prevalence of MS was the same in repatriated prisoners of the Vietnam War with and without Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD) when compared with a control group, whereas Weiss et al. [5] found that PTSD is associated with increased rates of MS within an African-American urban population. More recently, Albert et al. [6], using a cross-sectional approximation, found that the prevalence of MS in a sample of patients with Obsessive-Compulsive Disorder is higher than those reported in the Italian general population.

In an effort to understand the MS and its relationship to DM2, these pathological entities had been studied using animal models that resemble its etiology at least partially.

Genetically modified rodents showing signs of MS/DM2 have been used to study the association between these pathologies (MS/DM2) and anxiety disorders, obtaining conflicting results. Accordingly, an anxiogenic-like profile in OLETF rats [7, 8] and ob/ob mice [9] was reported, whereas no changes in anxiety-like behavior were observed in obese Zucker rats by Chauloff [10]. Moreover, anxiolytic-like effects were reported by Sharma et al. in db/db mice [11]. Thus, further analysis using other animal models of MS to study this relationship is necessary.

Another experimental strategy to model the MS and DM2 is by changing the amount of fat or sugar in the diet of experimental rodents (for a review see [12]). In the last years two different groups of research, Marks et al. [13] and Sharma and Fulton [14] demonstrated



that rodents submitted to a high-fat diet showed an anxiogenic-like profile in different anxiety paradigms. However, anxiety-like behavior has not been studied in animals subjected to a high-carbohydrate diet. Recently, Larqué et al. [12] reported that exposing young adult Wistar rats to high sucrose in drinking water for 8 weeks induces a MS-like condition, i.e., abdominal obesity, insulin resistance, elevated blood pressure and dyslipidemia. Moreover, when the animals are kept under the above experimental conditions for longer periods (24 weeks), a slight hyperglycemia is added to the signs [15]. Since the relationship between MS and anxiety disorders using animal models which induce a MS-like condition by using a high-carbohydrate regime has not been explored, the anxiety-like behavior of rats on a long-term sucrose diet in three different anxiety paradigms was studied.

## **Methods**

Adult male Wistar rats (250-280 g) bred in the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, were used. Rats were housed in a controlled environment (temperature 22°C, lights on 06:00-18:00 h), two animals per cage with food (Purina chows LabDiet 5001) and water *ad libitum*. The experiments were conducted according to the guidelines established by the local Mexican Ethics Committee according to the "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals", Council for International Organizations of Medical Sciences, 2010. Efforts were taken to minimize animals' suffering throughout all experimental procedures.

### *Sucrose treatment*

In order to model MS, a 20% (w/v) of sucrose solution was provided *ad libitum* to the treated group for 24 weeks, as previously described [14]. Tap water was given to the control group. Behavioral evaluations were carried out during the last week of this treatment. Both, sucrose-treated and control rats were fed with standard rat chow composed by 28.5% protein, 13.5% fat, and 58% carbohydrates.

### *Metabolic parameters*

All measurements were performed at the end of the treatment. Rats were fasted for a 12 h period, under which the sucrose solution was replaced with plain water. Animals were anesthetized with an intraperitoneal sodium pentobarbital (40 mg/kg) injection to obtain blood and abdominal fat samples (peripancreatic and epididymal adipose tissue). After sampling, animals were euthanized by cervical dislocation. Blood samples were collected from the inferior cava vein in heparinized tubes to obtain plasma and stored at -20°C until its posterior use. Plasma insulin level was determined with a Mercodia Ultrasensitive rat insulin ELISA system (catalog no. 10-1137-10; ALPCO) and plasma glucose was measured with a glucose analysis Kit (Quantichrom, BioAssay Systems, Hayward, CA USA). Triglycerides were determined by a photometric method (assays kits were manufactured by Beckman Coulter, Inc.). Quantification of plasmatic leptin and resistin levels were also carried out using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, according to the manufacturer's instructions (Quantikine Mouse leptin, R&D Systems and Rat resistin ELISA GenWay were utilized for leptin and resistin assays, respectively).

### *Blood pressure*

The tail-cuff procedure was used to obtain systolic blood pressure (SBP) with a tail-cuff equipment (Landing, NJ USA). Animals were trained in several sessions before to practice the SBP measurement, which was done in preheated and awake rats. We performed an average of five readings to obtain individual SBP values. Normal SBP was considered between 110–135 mm Hg, while hypertension was considered when values were above 140 mm Hg.

### *Behavioral procedures*

Animals were handled 5 min once a day for 3 or 4 consecutive days before testing. Rats were kept overnight in the experimental room in order to avoid context influences and to keep their basal anxiety levels as low as possible. Behavioral experiments were conducted between 10:00 and 16:00 hrs in a sound-attenuated room equipped with video-recording facilities. The devices used for the evaluation of behavior were placed beneath the video camera, and behavior was recorded in the absence of any observer. In all the experiments

rats were assigned to each group and (control or sucrose-treated) tested in a randomized manner.

#### *Elevated Plus-Maze (EPM)*

The maze used in this work was based essentially on the design of Pellow et al. [16] and was constructed as previously described [17] with slight modifications, in order to allow obese rats to move freely. The maze consisted of two open arms (50 x 13 cm) divided in three quadrants, and two enclosed arms (50 x 13 x 40 cm) with an open roof. The arms intersected at the central square (13 x 13 cm). The maze was elevated 50 cm from the floor by a pedestal joined to the central square (see diagram). In order to avoid rats falling from the maze, wooden sledges (0.5 x 0.5 cm) were attached along the edges of the open arms. Rats were placed on the central square of the maze facing an open arm at the beginning of the test, and were allowed to explore the maze for 5 min. The number of entries to the open arms (expressed as the percentage of the total number of arm entries), and the total time spent in these arms of the maze were taken as an anxiety index (the higher the index the lower anxiety). The total number of arms (open + closed) entries was taken as a measure of locomotion [16, 17]. An entry was counted when the four paws of the rat were placed in the respective arm. The maze was cleaned with detergent and dried before each trial. The illumination level at the central square of the maze was 5.1 lux during testing.

#### *Open-Field Test (OFT)*

Since time spent in the center of the open field is considered a measure related to anxiety [18], in order to further analyze this behavior, sucrose-treated and control rats were placed in an open field apparatus 1 min after being evaluated in the EPM. Evaluations were carried out in an arena (50 x 50 x 30 cm) divided into 25 squares (10 x 10 cm) as previously described [17]. Each rat was placed in the center of the arena and was allowed to explore it 5 min. The time spent in the central squares of the arena, as well as the time that the rat spent in freezing behavior was quantified off line. Freezing behavior was defined as the absence of any movement of the rat with the exception of those needed for breathing. For measuring locomotion photoelectric-cells were used to record the horizontal movements of the animals through the arena (OMNIALVA, Mexico City, Mexico). Each wall contained

10 photoelectric cells separated by 5 cm from each other that were located 4.0 cm above the arena. The box was interfaced with a PC that allowed estimating quantitatively the number of beam interruptions through the photocells during the locomotion of the animal in the arena and transforming them into arbitrary locomotion events with a sample frequency of 10 Hertz. Light intensity at the center of the arena was 138 lux.

#### *Shock-Probe/Burying Test (SPBT)*

The test was carried out essentially as described by Treit et al. [19] and Fernández-Guasti et al. [20]. The test was conducted in an acrylic cage (27 x 16 x 23 cm) with its floor covered with a uniform layer (5 cm) of fine sawdust. The cage was equipped with an electrified probe (7 cm long, 0.5 cm thick) which protruded from one of its walls, 5 cm above the bedding and through which the rats received an electric shock (0.3 mA) any time they come into contact with the probe. The current was generated by a constant current shocker (LaFayette Instruments, Inc). During the test four parameters were recorded: the total amount of time that the rat spends burying the probe either with the forepaws or with the hind paws (burying behavior), the total amount of time that the rat spends lying or sitting with the body motionless except for tiny and slow lateral movements of the head (freezing behavior), the burying behavior latency (time elapsed from the first shock to the start of the burying behavior), and the number of shocks received by the rat during the test.

#### *Statistical analysis*

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. Normal distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Student's t-test or Mann-Whitney test were used to compare both experimental groups (Control vs. Sucrose-treated). Significance was set at  $P < 0.05$ . Statistical parameters were computed using GraphPad Prism 5 statistical software.

## **Results**

### *a. Metabolic parameters*

Table 1 shows the metabolic changes elicited by a treatment with a solution of 20% sucrose for 24 weeks administered *ad libitum*. This experimental manipulation resulted in a

significant increase in body weight and body mass index when compared with the control group. Moreover, animals submitted to this treatment showed an increase in the total abdominal fat (peripancreatic+epididymal), which also caused a significant rise in the abdominal circumference as compared to the controls. Furthermore, we observed that systolic blood pressure was significantly increased in the sucrose-treated group, without changes in heart rate. Likewise, a statistically significant increase in plasma glucose, insulin and triglycerides levels was also observed in the sucrose-treated group when compared with the control group. Interestingly, both plasma leptin and resistin levels were elevated as compared to the control group.

*b. Behavioral evaluations*

*- Elevated-Plus Maze*

As depicted in Figure 1, sucrose-treated rats showed a trend to decrease the time spent in the open arms of the EPM when compared with the control group ( $U=230$ ,  $P=0.0534$ ) (Fig. 1a). A similar effect was found in the percentage of entries into the open arms of the maze ( $U=230$ ,  $P=0.0534$ ) (Fig. 1b). No effects were observed in the total number of entries into the open + closed arms of the maze ( $U=270$ ,  $P=0.2861$ ) (Fig. 1c).

A qualitative analysis of the behavior displayed by rats in the EPM (see table 2) showed that a higher percentage of animals within the sucrose-treated group did not explore the open arms of the maze at all, when compared with the control group (sucrose-treated group: 70.83% vs. control group: 44.4%). Moreover, the number of animals which explored the second and third quadrants of the open arms of the maze was lesser within the sucrose-treated group than within the control group (second quadrant: 6 vs. 14; third quadrant: 2 vs. 7). Altogether, this data show that animals of the sucrose-treated group quantitatively and qualitatively exhibit a tendency to reduce both the entries to and the time spent in the open arms of the maze.

*- Open Field Test*

As shown in Figure 2a, sucrose-treated rats exhibit a significant reduction in the time spent in the central squares of the open field, as compared with the control group ( $U=194$ ,

P=0.0094). Moreover, a significant increase in freezing behavior was observed in the sucrose-treated rats (U=149, P=0.0027) (Fig. 2b). No changes were observed in locomotor activity between sucrose- and water-treated animals, as measured in this test (U=125.5, P=0.2546) (Fig. 2c).

- *Shock-Probe Burying Test*

As indicated in Figure 3, sucrose-treated rats submitted to the SPBT showed a significant increase in the percentage of time spent in burying behavior as compared with the controls (U=93, P=0.0496) (Fig. 3c). No effects were elicited in the other parameters measured during testing. Thus, neither latency to bury (U=202, P=0.8449) (Fig. 3a), total number of shocks received (U=181.5, P=0.2405) (Fig. 3b) nor the percentage of time spent in freezing behavior (U=226, P=0.3924) (Fig. 3d) were affected. Only the animals that displayed burying behavior were included in this analysis.

## **Discussion**

As reported by Velasco et al. [15] rats drinking *ad libitum* from a concentrated (20%; w/v) sucrose solution for 24 weeks develop a number of metabolic and physiological alterations such as: body weight gain, abdominal obesity, hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidaemia and elevated blood pressure which altogether resembles what in humans is being considered as a MS [1, 21, 22]. Moreover, hyperleptinemia and increased plasma resistin levels were also observed.

On this scenery, the main finding of the present study is the observation of an anxiogenic-like profile in adult rats kept under a long-lasting carbohydrate intake, which adds to the alterations observed in animals with MS. This anxious-like condition, present in sucrose-treated rats, was observed in two of the three anxiety paradigms studied. Thus, in the OFT an avoidance to explore its central part and an increase in freezing behavior was noticed. In addition sucrose-treated rats showed an increase in burying behavior in the SPBT, which is also considered a sign of anxiety [17, 23]. It is worth mentioning that the increase in anxiety appears to be a specific effect, since under the same experimental conditions locomotion was not affected despite of rise in body weight and the abdominal obesity suffered by animals of the sucrose-treated group. Hence, locomotor activity in the OFT as

well as the EPM, in which the total number of entries into the arms (open+closed arms) of the maze is considered as an in-built measure of locomotion [16], was not affected.

Thus, the results obtained in this study both, using the OFT and the SPBT, indicate that sucrose treatment in rats induced an anxiogenic-like profile when compared with their respective controls. Our data are in line with the observations made by Yamamoto et al. [7] and Li et al. [8], which reported an anxiogenic-like profile in the EPM, the Light-Dark box (LDB) [7] and the Food Neophobia test [8] using OLETF rats, which show obesity, impaired glucose tolerance and late onset of hyperglycemia [24-26]. In addition, Harris and colleagues showed an anxiogenic-like profile using the LDB and EPM in the transgenic BPAa mice, a model for obesity and DM2 [27]. Further support to these results comes from the work of Asakawa et al., [28] who using Ins<sup>2Akita</sup> transgenic mice (which show hypoinsulinemia and hyperglycemia), reported a reduction in the number of entries and the time spent by these animals in the open arms of the EPM and increased immobilization time in the OFT.

Our data are also similar to those reported by Marks et al. [13] and Sharma and Fulton [14] who showed that rodents having a high fat-diet displayed an anxiogenic-like profile in the EPM [13, 14]; LDB, marble burying test [13] and OFT [14].

The lack of significant changes observed in the EPM in this study may have arise as a consequence of a “sealing effect”, since under our experimental conditions a considerable percentage of animals within the control group (44%) did not explore the open arms of the maze at all. This fact makes difficult the comparison of an anxiety-like behavior between both, the control and sucrose-treated groups. Similar observations have also been reported by other authors [7, 8]. However, the qualitative analysis done in this paradigm showed that rats within the sucrose-treated group explored both less frequently and less thoroughly the open arms of the EPM than the controls. In addition, the tendency detected in our experiments within the sucrose-treated animals to reduce both, the time spent in the open arms, and the number of entries to these spaces, are in line with the results obtained in the OFT and the SPBT and support the idea that sucrose-treated rats exhibit an anxiogenic-like profile.

The mechanisms involved in the increase of anxiety-like behavior in sucrose-treated rats observed in this work are unknown. However, protein glycation -which has been suggested to underlay the late effects of diabetes through the formation of advanced glycation endproducts (AGEs)- [29, 30], may have had a role in the development of the anxiety-like behavior observed in this work, since the anxiogenic-like effects observed in our experiments did not occur either at 8 or 12 weeks of sucrose treatment (data not shown) but at 24 weeks when the hyperglycemic condition has already been well established.

On the other hand, plasma leptin, an adipocyte-derived hormone encoded by the *ob* gene was found elevated in this work. Since leptin deficient mice (*ob/ob*) exhibit an anxious phenotype [9], and acute leptin administration produces both anxiolytic effects in normal mice [31] and attenuates anxiety in *ob/ob* mice [32], it may be feasible that leptin resistance may be involved in the anxiogenic effects reported in this paper. In support to this possibility, it has been reported that diet-induced obese rats show a self-resistance state to leptin within the hypothalamus [33-35] and the ventral tegmental area (VTA) [36, 37], which may have been evolved through a diminished leptin receptor gene expression accompanied by reduced signal transduction [35] and/or a putative reduction in leptin transport into the cerebro-spinal cord fluid (CSF) [38]. It is generally admitted that amygdala plays a paramount role in the modulation of anxiety [39-41] and considerable experimental evidence indicates that dopaminergic receptor mechanisms play an important role in this modulation [42-44]. Since VTA neurons are the origin of the dopamine (DA) innervation of the amygdala [43, 45, 46] and it has been demonstrated that conditional knock-out mice lacking leptin receptor (*Lepr<sup>dat-Cre</sup>* mice) in the VTA exhibit an increase in burst firing and show an anxiogenic profile [47], it is conceivable that leptin resistance within VTA may underlie the anxiety behavior observed in our experiments. Moreover, it may be possible that such anxiogenic effects may be mediated through activity of dopamine D1 receptors since the intra-amygdaloid administration of SCH-23390, a selective D1 receptor antagonist, attenuated anxiety in *Lepr<sup>dat-Cre</sup>* mice [47] and induces anxiolytic responses in rats subjected both to the White and Dark test [48] and the EPM [49]. Since fructose has been reported to provoke leptin resistance [50, 51] and in this paper experimental rats were treated with a 20 % sucrose solution to induce a metabolic syndrome, it is conceivable that fructose from digested sucrose had contribute, after its



intestinal absorption, to the production of both the metabolic syndrome and leptin resistance.

In agreement with other works [52-55], resistin, another adipocyte-derived hormone, was also found increased in our sucrose-treated rats. Since recent studies have suggested a role of resistin in depression [56], and comorbidity between depression and anxiety is a common finding in the clinical setting, it is tempting to suggest that the high resistin levels found in our sucrose-treated rats had contributed to the anxiety-like behavior observed in them. Future studies on the role of resistin on anxiety are warranted.

A significant augmentation of both abdominal fat and abdominal circumference in the sucrose-treated group was found in this work. It is well known that abdominal fat is a source of proinflammatory molecules (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ ) [57, 58] and that waist circumference is related to depressive/anxiety disorders [59, 60]. Since i.c.v. injection of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  produces anxiety-like behavior in rats in the EPM [61], and an increase in the expression of IL-2 RNAm levels has been found associated with an anxiety-like profile in the same paradigm [62, 63] it might be possible that proinflammatory molecules released from the abdominal fat of our sucrose-treated rats may have also played a role in the anxiogenic profile induced in these animals. It is clear, however, that further experiments will be necessary to find out whether inflammatory cytokines are indeed elevated in our sucrose treated rats and whether they have a role in anxiety.

Finally, the possibility that the increase in anxiety-like behavior observed in sucrose-treated rats may be a consequence of the hypertension shown by these animals seems to be unlikely, since elevated blood pressure is already present (8 and 12 weeks after sucrose treatment) before they develop anxiety-like behavior (data not shown).

In conclusion, the results of this study support the notion that chronic sucrose treatment results in a MS-like condition in rats and that there exists a close relationship between this pathological entity and anxiety-like behavior. Further studies will be needed to disclose the nature of the mechanisms underlying such associations.

## **Aknowledgements**

This study was supported in part by the grants IN200508, IN203111 and IN204314 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) given to D.R-S during her graduate studies within the program of Doctorado en Ciencias Biomédicas from the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The authors are also grateful to Dr. Luis BernardoTovar y Romo for valuable comments to the manuscript. We also thank Minerva Crespo-Ramírez and Félix Sierra for technical support. The assistance of Javier Rebolledo-Serrano in conducting these experiments is fully appreciated. We are also indebted to the Computing Unit of the Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and in particular to Francisco Pérez-Eugenio for his help during this work.

## References

- [1] Chew GT, Gan SK, Watts GF: Revisiting the Metabolic Syndrome. *Med J Aust* 2006;185:445-449.
- [2] Carroll D, Phillips AC, Thomas GN, Gale CR, Deary I, Batty GD: Generalized anxiety disorder is associated with metabolic syndrome in the Vietnam experience study. *Biol Psychiatry* 2009;66:91-93.
- [3] Hildrum B, Mykletun A, Midthjell K, Ismail K, Dahl AA: No association of depression and anxiety with the metabolic syndrome: the Norwegian HUNT study. *Acta Psychiatr Scand* 2009;120:14-22.
- [4] Linnville S, Hoyt RE, Moore JL, Segovia F, Hain RE: Posttraumatic stress disorder and metabolic syndrome: retrospective study of repatriated prisoners of war. *Mil Med*. 2011;176:369-374.
- [5] Weiss T, Skelton K, Phifer J, Jovanovic T, Gillespie CF, Smith A, Umpierrez G, Bradley B, Ressler KJ: Posttraumatic stress disorder is a risk factor for metabolic syndrome in an impoverished urban population. *Gen Hosp Psychiatry* 2011;33:135-142.
- [6] Albert U, Aguglia A, Chiarle A, Bogetto F, Maina G: Metabolic syndrome and obsessive-compulsive disorder: a naturalistic Italian study. *Gen Hosp Psychiatry* 2013;35:154-159.
- [7] Yamamoto Y, Akiyoshi J, Kiyota A, Katsuragi S, Tsutsumi T, Isogawa K, Nagayama H: Increased anxiety behavior in OLETF rats without cholecystokinin-A receptor. *Brain Research Bulletin* 2000;53:789-792.
- [8] Li XL, Aou S, Hori T, Oomura Y: Spatial memory deficit and emotional abnormality in OLETF rats. *Physiology and behavior* 2002;75:15-23.
- [9] Finger BC, Dinan TG, Cryan JF: Leptin-deficient mice retain normal appetitive spatial learning yet exhibit marked increases in anxiety-related behaviors. *Psychopharmacology* 2010;210:559-568.
- [10] Chauloff F: Failure to find behavioral differences between lean and obese Zucker rats exposed to novel environments. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994;18:780-782.
- [11] Sharma AN, Elased KM, Garrett TL, Lucot JB: Neurobehavioral deficits in db/db

- diabetic mice. *Physiology and Behavior* 2010;101:381-388.
- [12] Larqué C, Velasco M, Navarro-Tlaveros V, Duhne M, Aguirre J, Gutiérrez-Reyes G, Moreno J, Robles-Díaz G, Hong E, Hiriart M: Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models. *IUBMB Life* 2011;63:831-839.
- [13] Marks DR, Trucker K, Cavallin MA, Mast TG, Fadool DA: Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety and olfactory behaviors. *Neuroscience* 2009;29:6734-6751.
- [14] Sharma S and Fulton S: Diet-induced obesity promotes depressive-like behavior that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:382-389.
- [15] Velasco M, Larqué C, Gutiérrez-Reyes G, Arredondo R, Sánchez-Soto C, Hiriart M: Metabolic Syndrome induces changes in KATP-channels and calcium currents in pancreatic  $\beta$ -cells. *Islets* 2012;4:302-311.
- [16] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M: Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 1985;14:149-167.
- [17] Pérez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Crespo-Ramírez M, Marcellino D, Chansson AC, Fuxe K: Distribution of Dopamine D2-like receptors in the rat amygdala and their role in the modulation of unconditioned fear and anxiety. *Neuroscience* 2012; 201:252-266.
- [18] Prut L and Belzung C: The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3-33.
- [19] Treit D, Menard J and Pesold C: The shock-probe/burying test. *Neurosci Protocols* 1994;94-010-02-01–94-010-02-09.
- [20] Fernández-Guasti A, Ferreira A, Picazo O: Diazepam but not buspirone, induces similar anxiolytic-like effects in lactating and ovariectomized Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:85-93.
- [21] Alberti KG, Zimmer P, Shaw J: Metabolic syndrome- a new world-wide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diab Med* 2006;23:469-480.
- [22] Day C: Metabolic syndrome, or what you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4:32-38.
- [23] De Boer SF and Koolhas JM: Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology

and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* 2003;463:145-161.

[24] Kimura K, Toyota T, Kakizaki M, Kudo M, Tokebe K et al.: Impaired insulin secretion in the spontaneous diabetes rats. *Tokohu J Exp Med* 1982;137:453-459.

[25] Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, et al.: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 1992;41:1422-1428.

[26] Schroeder M, Zagoory-Sharon O, Shbiro L, Marco A, Hyun J, Moran TH, Bi S, Weller A: Development of obesity in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol regul Integr Comp Physiol* 2009; 297:R1749-1760.

[27] Harris RBS, Zhou J, Shi M, Redmann S, Mynatt RL, Ryan DH: Overexpression of agouti protein and stress responsiveness in mice. *Physiology and Behavior* 2001;73:599-608.

[28] Akasawa A, Toyoshima M, Inoue K, Koizumi A:  $Ins2^{Akita}$  mice exhibit hyperphagia and anxiety behavior via the melacortin system. *International Journal of Molecular Medicine* 2007;19:649-652.

[29] Sensi M, Pricci F, Andreani D, Di Mario U: Advanced nonenzymatic glycation end products (AGE): their relevance to aging and the pathogenesis of late diabetic complications. *Diabetes Res* 1991;16:1-9.

[30] Ulrich P and Cerami A: Protein glycation, diabetes and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:1-21.

[31] Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu X-Y: Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. *Psychopharmacology* 2010;207:535-545.

[32] Asakawa A, Inui A, Inui T, Katsuura G, Fujino M, Kasuga: Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice. *Journal of diabetes and its complications* 2003;17:105-107.

[33] Widdowson PS, Upton R, Buckingham R, Arch J, Williams G: Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet induced obesity. *Diabetes* 1997; 46:1782-1785.

[34] Levin BE, Dunn-Meynell AA: Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283:R941-R948.

- [35] Zhang Y and Scarpance PJ: The role of leptin resistance and obesity. *Physiol and Behav* 2006; 88:249-256.
- [36] Matheney M, Shapiro A, Tümer N, Scarpance PJ: Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. *Neuropharmacology* 2011;60:480-487.
- [37] Scarpance PJ, Matheney M, Kirichenko N, Gao YX, Tümer N, Zhang Y: Leptin overexpression in VTA trans-activates the hypothalamus whereas prolonged leptin action in either region cross-desensitizes. *Neuropharmacology* 2013;65:90-100.
- [38] Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhand PL, Sinha MK, Considine RV: Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996;348:159-161.
- [39] LeDoux JE: Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:155-184.
- [40] Ehrlich I, Humeau Y, Grenier F, Ciochi S, Herrey C, Luthi A: Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 2009;62:757-771.
- [41] Pape HC and Paré D: Plastic synaptic networks of the amygdale for the acquisition, expression and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev* 2010;90:419-463.
- [42] Pezze MA and Feldon J: Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol* 2004;74:301-20.
- [43] Pérez de la Mora M, Gallegos-Cari A, Arizmendi-García Y, Marcellino D, Fuxe K: Role of Dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: structural and functional analysis. *Prog Neurobiol* 2010;90:198-216.
- [44] Palomares-Castillo E, Hernández-Pérez O, Pérez-Carrera D, Crespo-Ramírez M, Fuxe K, Pérez de la Mora M: The intercalated paracapsular islands as a module for integration of signals regulating anxiety in the amygdala. *Brain Res* 2012;1476:211-234.
- [45] Dalhström A and Fuxe K: Evidence of the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell-bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 1964;62:1-55.
- [46] Fuxe K: Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Scand* 1965;64:39-85.
- [47] Liu J, Pérez SM, Zhang W, Lodge DJ, Lu X-Y: Selective deletion of the leptin receptor

in dopamine neurons produces anxiogenic-like behavior and increases dopaminergic activity in amygdala. *Molecular Psychiatry* 2011;16:1024-1038.

[48] Pérez de la Mora M, Cárdenas-Cachón L, Vázquez-García M, Crespo-Ramírez M, Jacobsen K, Höistad M, Agnati L, Fuxe K: Anxiolytic effects of intra-amygdaloid injection of the D1 antagonist SCH23390 in the rat. *Neurosci Lett* 2005;377:101-105.

[49] Bananej M, Karimi-Sori A, Zarrindast MR, Ahmadi S: D1 and D2 dopaminergic systems in the rat basolateral amygdala are involved in anxiogenic-like effects induced by histamine. *J Psychopharmacol* 2012;26:564-574.

[50] Scarpace PJ and Zhang Y: Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009;296:R493-500.

[51] Vaselli JR, Scarpace PJ, Harris RB, Banks WA: Dietary components in the development of leptin resistance. *Adv Nutr* 2013;4:164-175.

[52] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM et al.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-312.

[53] Dewaga-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R et al.: Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5452-5455.

[54] Owecki M, Miczke A, Nikisch E, Pupek-Musialik D, Sowinski J: Serum resistin concentrations are higher in human obesity but independent from insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011;119:117-121.

[55] Sadashiv-Tiwari S, Paul BN, Kumar S, Chandra A, Dhananjai S et al.: Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance. *World J Diabetes* 2012;3:135-141.

[56] Lehto SM, Huotari A, Niskanen L, Tolmunen T, Koivumaa-Honkanen H, Honkalampi K et al.: Serum adiponectin and resistin levels in major depressive disorder. *Acta Psychiatr Scand* 2010;121:209-215.

[57] Ronti T, Graziana L, Mannarino E: The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical Endocrinol* 2006; 64:355-365.

[58] Hryhorczuk C, Sharma S, Fulton SE: Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front in Neurosci* 2013;7:177.

[59] Takeuchi T, Nakao M, Nomura K, Yano E: Association of metabolic syndrome with

depression and anxiety in Japanese men. *Diabetes Metab* 2009;35:32-36.

[60] Luppino FS, van Reedt Dortland AK, Wardenaar KJ, Bouvy PF, Giltay EJ, Zitman FG, Penninx BW: Symptom dimensions of depression and anxiety and the metabolic syndrome. *Psychosom Med* 2011;73:257-264.

[61] Connor TJ, Song C, Leonard BE, Merali Z, Anisman H: An assessment of central interleukin-1 beta, -2, -6 and tumor necrosis factor- alpha administration on some behavioral, neurochemical endocrine and immune parameters in the rat. *Neuroscience* 1998;84:923-933.

[62] Pawlak CR, Ho YJ, Schwarting RK, Bauhofer A: Relationship between striatal levels of interleukin-2 mRNA and plus-maze behavior in the rat. *Neurosci Lett* 2003;341:205-208.

[63] Pawlak CR, Schwarting RK, Bauhofer A: Cytokine mRNA levels in brain and peripheral tissues of the rat: relationships with plus-maze behavior. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;137:159-65.



## Figure legends

**Fig. 1** Effect of 24 weeks-sucrose treatment on anxiety-like behavior in the elevated-plus maze. Sucrose-treated rats showed a tendency ( $P=0.0534$ ) to reduce both, time spent in open arms (a) and the percentage of open arms entries (b) when compared with the controls. No effects were observed on the total number of entries into the open+closed arms of the maze (c). Bars represent means  $\pm$  SEM. Mann Whitney Test. Control group  $n=27$ , sucrose-treated group  $n=24$ .

**Fig. 2** Effect of 24 weeks-sucrose treatment on anxiety-like behavior as measured in the Open Field test. Sucrose treated group exhibited a reduction in the time spent in the central squares (a) and an enhancement in the time spent in freezing behavior (b) as compared with the control group. No effects were observed in locomotion (c). Bars represent means  $\pm$  SEM. Mann Whitney Test,  $**P<0.001$ . Control group  $n=24$ , sucrose-treated group  $n=27$ .

**Fig. 3** Effect of 24 weeks-sucrose treatment in rats submitted to the Shock-Probe/Burying test. A significant increase was noticed in the sucrose treated group in the percentage of time spent in burying behavior (c) when compared with the control group. No significant effects were elicited on burying behavior latency (a), number of shocks received (b) and the percentage of time spent in freezing behavior (d). Bars represent means  $\pm$  SEM. Mann Whitney Test,  $*P<0.05$ . Control group  $n=18$ , sucrose-treated group  $n=17$ .

# Table 1

**Table 1.** Metabolic parameters measured in Control and Sucrose-treated rats

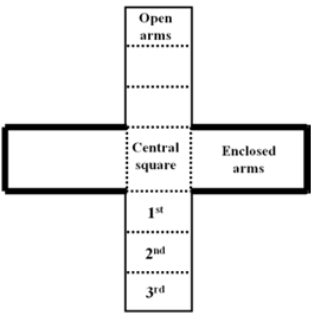
	<b>Control</b>	<b>Sucrose-treated</b>	<b>Size sample</b>
Body weight (g)	584 ± 13	667 ± 15 ***	70
Body length (cm)	27.3 ± 0.2	27.4 ± 0.2	70
Body mass index (Kg/m) <sup>2</sup>	4.1 ± 0.2	6.3 ± 0.2 ***	70
Abdominal circumference (cm)	22.4 ± 0.4	25.1 ± 0.4 ***	70
Total abdominal fat (g)	7 ± 1	18 ± 1 ***	70
Systolic blood pressure (mmHg)	125 ± 3	134 ± 4 *	20
Cardiac frequency (beats/min.)	341 ± 10	362 ± 10	20
Triglycerides (mg/dl)	43 ± 6	74 ± 9 ***	32
Plasma glucose (mg/dl)	201 ± 13	241 ± 25 *	40
Plasma insulin (mg/l)	5.1 ± 0.3	9.4 ± 0.8 ***	40
Plasma leptin (pg/ml)	5685 ± 733	25300 ± 3274 ***	32
Plasma resistin (ng/ml)	13 ± 0.6	28 ± 1.4 ***	32

Mean ± SEM; Student T-test, \* P<0.05, \*\*\* P<0.001

## Table 2

**Table 2.** Qualitative analysis of the behavior displayed by Control and Sucrose-treated rats in the Elevated-Plus Maze

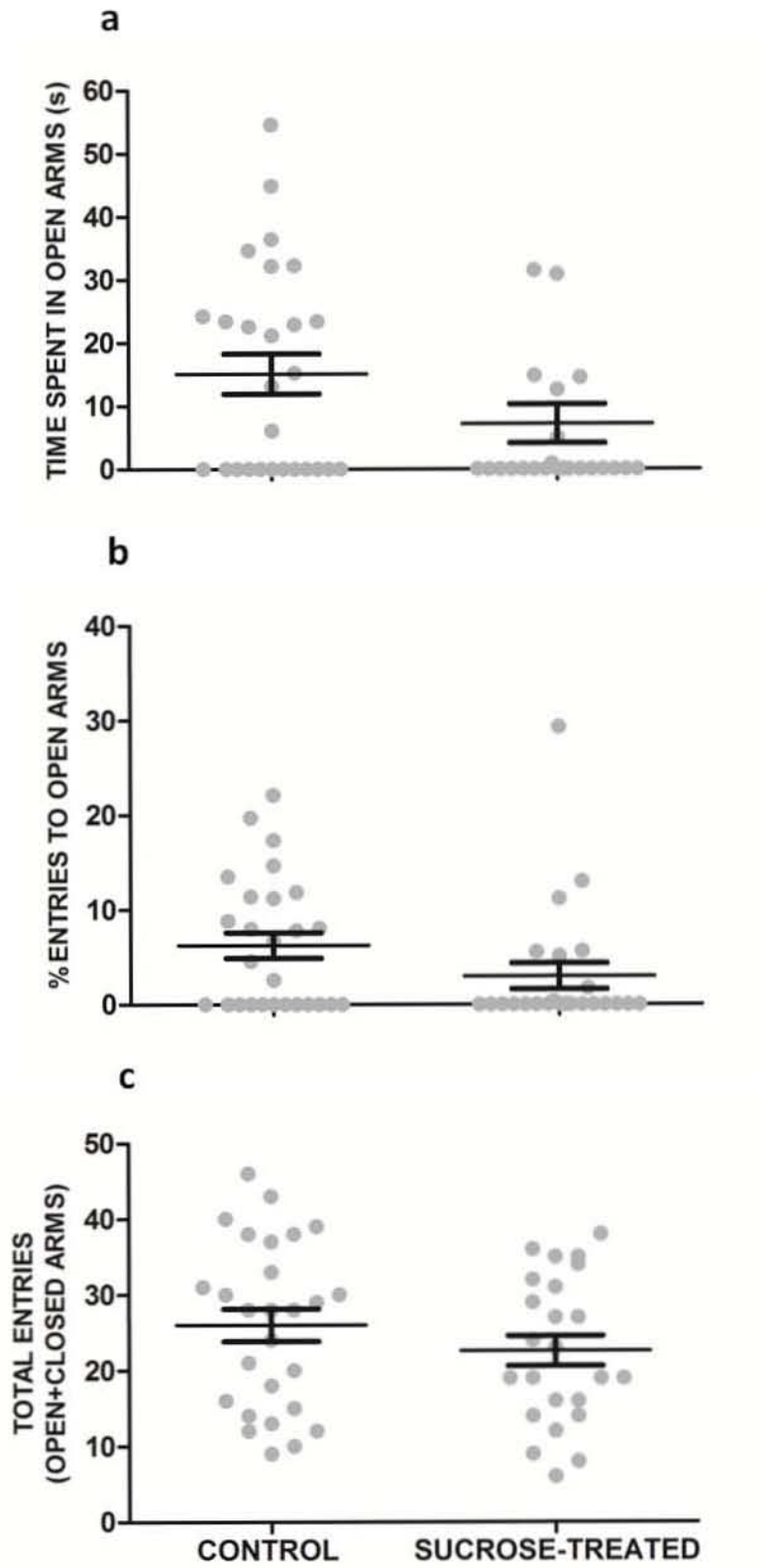
	<b>Control (n=27)</b>	<b>Sucrose-treated (n=24)</b>
Number of animals that explored the open arms	15 (55.6%) <sup>§</sup>	7 (29.2%)
Number of animals which entered to the 1 <sup>st</sup> quadrant of the open arms	15 (55.6%)	7 (29.2%)
Number of animals which entered to the 2 <sup>nd</sup> quadrant of the open arms	14 (51.9%)	6 (25%)
Number of animals which entered to the 3 <sup>rd</sup> quadrant of the open arms	7 (25.9%)	2 (8.3%)



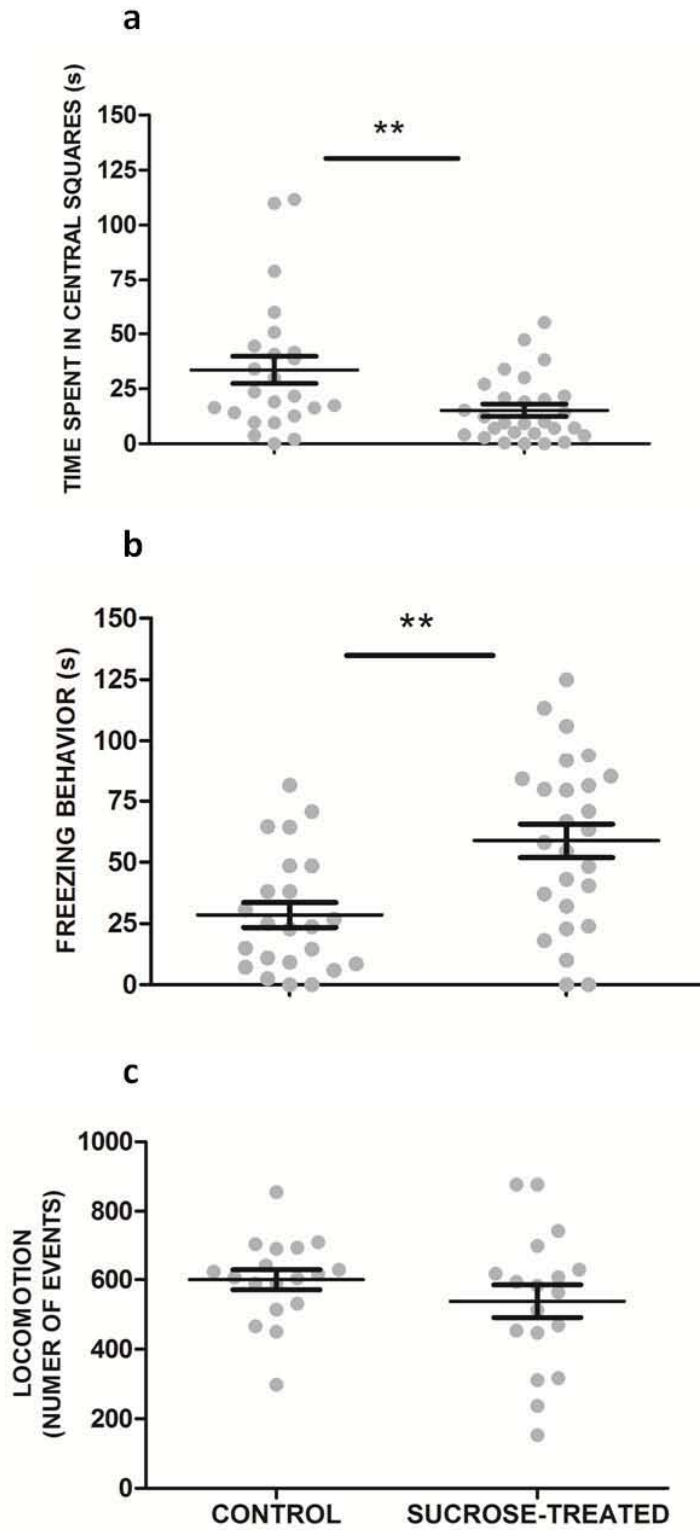
EPM  
diagram

<sup>§</sup> 100 % corresponds to the total number of animals in each group

**Figure 1**



**Figure 2**



# Figure 3

