



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL POLIPÉPTIDO ACTIVADOR DEL
ADENILATO CICLASA DE LA PITUITUARIA ANTERIOR (PACAP) SOBRE
CONDUCTAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Psicología

PRESENTA:

Bryan Rojas Lita

DIRECTOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

REVISOR: DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

SINODAL: DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO

SINODAL: DRA. IRMA YOLANDA DEL RÍO PORTILLA

SINODAL: MTRO. JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ SANTOS

Proyecto apoyado por:

DGAPA-PAPIIT 305715

PAPIME 300715



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“Cualquier destino, por largo y complicado que sea, consta en realidad de un solo momento: el momento en que el hombre sabe para siempre quién es”

“Somos nuestra memoria, somos ese quimérico museo de formas inconstantes, ese montón de espejos rotos”

Jorge Luis Borges

Agradecimientos.

A mi mamá y a mi papá, por darme siempre todo su apoyo y todo su amor. Gracias por enseñarme con el ejemplo el valor del trabajo y la constancia. Los amo.

A mis hermanos Erick y Kevin y a mi hermana Karen, por todos los buenos momentos en familia, gracias por soportarme. Los admiro a los tres por su inteligencia y dedicación. Los quiero.

A mis tíos y tías, por su cariño, por siempre estar al pendiente de mí y por sus consejos.

A mis mentores Hugo y Diana, por darme la oportunidad de acercarme a la investigación científica y por contagiarme su amor a la ciencia. Gracias por todos sus valiosos consejos.

A los NETS: Martin, Kenji, Mariana, Pau, Aline, por las gratas experiencias dentro y fuera del lab, las discusiones y charlas con las que aprendimos juntos.

A Universum y a la DGDC, por darme la oportunidad de estar entre sus salas y fuera de ellas como mediador. Por permitirme compartir lo poco que se con tan diversos públicos y en el camino aprender un montón de cosas. Espero algún día retribuirle haciendo divulgación de la ciencia de calidad.

A los biocerebros: Cris, Monse, Gris, Eva, Susana, Jesi, Dani, Juanjo, Luisa, Daniel, por las alegrías, el trabajo en conjunto y los buenos ratos, porque convivir con ustedes es sinónimo de risas y de aprender algo nuevo, siempre. Gracias por su amistad.

A mis mejores amigos de la fac: Toño y Uriel por ser la mejor compañía durante la carrera. Los quiero marranos.

A Cris. Por ser más que una amiga y estar en los momentos difíciles. Por escucharme la mitad de las veces, por las risas y las charlas ñoñas. Te quiero.

A Octavia, por ser una parte fundamental de que me aventurara a la investigación. Por tu amor incondicional y por todos los momentos que compartimos. Te quiero flaquita.

A Sonia, porque sin tu ayuda este proyecto se hubiera tardado el doble del tiempo. Gracias por todo el apoyo, los cafés por las mañanas y las charlas. Con tu dedicación y amor a la investigación, me inspiras a seguir haciendo ciencia.

A la UNAM, por mi formación, porque en sus aulas y fuera de ellas me permitió aprender y trabajar en lo que me gusta. Espero retribuirle con el correcto ejercicio de lo aprendido.

Resumen

El estrés es un mecanismo adaptativo que permite a cualquier organismo enfrentar las demandas ambientales (v.g. físicas, psicológicas y/o sociales) y con ello permite la supervivencia del mismo. Existen condiciones, como la cronicidad, en donde la respuesta de estrés se mantiene exacerbada aun cuando los estímulos que lo causaban no están presentes, bajo estas circunstancias la salud física y mental se ven afectadas aumentando la probabilidad de desarrollar diversas patologías como el trastorno de estrés postraumático (TEPT) y los trastornos de ansiedad; con una mayor prevalencia en mujeres que en hombres. Existen evidencias de que el Polipéptido Activador del Adenilato Ciclasa de la Pituitaria anterior (PACAP), es capaz de mimetizar la respuesta neuroendocrina de estrés. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la administración de PACAP en la amígdala central que es una estructura implicada en el mantenimiento y severidad de varias conductas relacionadas con el estrés, en dos pruebas conductuales específicas: el campo abierto y el laberinto cero elevado. Además este estudio propuso la comparación entre sexos del efecto de este polipéptido. Los resultados indicaron que los animales infundidos con PACAP aumentaron la frecuencia y tiempo de algunas conductas tipo ansiedad como los cruces hacia el brazo abierto y el congelamiento, este último aumento de manera más evidente en las hembras. Los resultados sugieren que la infusión de PACAP en amígdala tiene efectos en conductas relacionadas a la ansiedad y otros estudios más profundos son valiosos para identificar los mecanismos de acción del polipéptido y su relación con la ansiedad.

PALABRAS CLAVE: Estrés, ansiedad, amígdala, PACAP.

Lista de abreviaturas:

CeA: Amígdala Central.

CRH: Factor liberador de corticotropina

HPA: Eje Hipotalámico-Pituitario-Adrenal.

PACAP: Polipéptido Activador del Adenilato Ciclasa de la Pituitaria anterior.

SAM: Sistema Simpático Adreno-Medular.

TEPT: Trastorno de estrés postraumático.

PVN: Núcleo Paraventricular del hipotálamo

BNST: Núcleo de la Cama de la Estria Terminal

AVP: Arginina Vasopresina

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

LTP: Potenciación a largo plazo

BLA: Amígdala Basolateral

BA: Núcleo Basal de la amígdala

LA: Núcleo Lateral de la amígdala

ITC: Células intercaladas de la amígdala

CORT: Corticosterona

PAG: Sustancia Gris Periacueductal

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido.

Icv: intracerebroventricular

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

Índice

Resumen.....	I
Abreviaturas.....	II
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Neurobiología del miedo, la ansiedad y el estrés.	2
2.1.1 Definiciones.....	2
2.1.2 Neurobiología del estrés: Diferencias entre miedo y ansiedad.....	4
2.1.3 Evaluación de conductas tipo-ansiedad en roedores	11
2.1.4 El papel de la amígdala en la respuesta de ansiedad	13
2.2 El rol del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria anterior (PACAP) en estrés y la ansiedad.....	15
2.2.1 Efectos fisiológicos	16
2.2.2 Efectos conductuales	19
3. Justificación.....	22
4. Objetivos.....	23
4.1 General.....	23
4.2 Específicos.....	23
5. Hipótesis.....	23
6. Método.....	24
6.1 Sujetos	24
6.2 Cirugía estereotáxica	24
6.3 Fármacos.....	25
6.4 Evaluación Conductual.....	25
6.4.1 Campo Abierto	26
6.4.2 Laberinto Cero Elevado.....	27
6.5 Verificación de colocación de cánulas	28
6.6 Análisis estadístico	29
7. Resultados.....	31
7.1 La administración de PACAP en CeA induce conductas tipo-ansiedad en machos y hembras evaluadas en laberinto cero elevado.....	31
7.2 La administración de PACAP en CeA disminuye la actividad de evaluación de riesgo en hembras.	33
7.3 La administración de PACAP en CeA disminuye la motricidad general en hembras.....	35
7.4 La administración de PACAP en CeA no afecta el número de cruces y el tiempo que pasan los animales en el centro del campo abierto.	36

7.5	La administración de PACAP en CeA aumenta la conducta exploratoria en machos y hembras.	38
7.6	La administración de PACAP en CeA aumenta la conducta de congelamiento en hembras.....	40
7.7	La administración de PACAP en CeA no tiene efectos sobre las conductas de afrontamiento al estrés.....	42
8.	Discusión	45
9.	Conclusiones y limitaciones	52
10.	Referencias	53

Índices de Figuras y Tablas

Figura 1. Respuesta fisiologica de estrés.....	6
Figura 2. Pruebas conductuales para evaluar conductas tipo-ansiedad en roedores..	12
Figura 3. Proyecciones de la amígdala hacia núcleos del tronco cerebral y del hipotálamo	14
Figura 4. Localización de células (●) y fascículos (-) que expresan PACAP..	17
Figura 5. Campo abierto. Esquema representativo.....	27
Figura 6. Laberinto Cero Elevado. Esquema representativo.....	28
Figura 7. Esquema representativo de la manipulación experimental.....	29
Figura 8. Tiempo en los brazos abiertos del laberinto cero elevado.	32
Figura 9. Cruces hacia los brazos abiertos del laberinto cero elevado..	33
Figura 10. Frecuencia de evaluación de riesgo en el laberinto cero elevado..	34
Figura 11. Tiempo de evaluación de riesgo en el laberinto cero elevado.	35
Figura 12. Cruces totales en campo abierto..	36
Figura 13. Cruces por el centro del campo abierto.....	37
Figura 14. Tiempo en el centro del campo abierto.....	38
Figura 15. Frecuencia de erguimiento en el campo abierto.....	39
Figura 16. Tiempo de erguimiento en campo abierto.....	40
Figura 17. Frecuencia de congelamiento en campo abierto.	41
Figura 18. Tiempo de congelamiento en campo abierto.	42
Figura 19. Frecuencia de acicalamiento en campo abierto.....	43
Figura 20. Tiempo de acicalamiento en campo abierto.....	44
Tabla 1. Comportamientos relacionados con el estrés y sus correlatos asociados	8

1. Introducción

El estrés es un conjunto de respuestas que permiten al organismo adaptarse a las demandas del ambiente y cuya finalidad es preservar la supervivencia del mismo. La expresión desadaptativa de estas respuestas (por ejemplo; una alta reactividad del sistema en ausencia de estresores) favorece que se desarrollen diversas patologías entre las que destacan las fobias, trastorno de estrés postraumático, depresión y ansiedad generalizada, por lo que es relevante conocer los mediadores que subyacen a estas respuestas desadaptativas. Entre el amplio espectro de respuestas que despliega el organismo se encuentran las dirigidas a la evitación activa de estos estímulos y las dirigidas hacia la predicción y evitación pasiva de estos. Todas ellas moduladas por circuitos que incluyen a estructuras como el hipocampo, la corteza prefrontal, el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN, por sus siglas en inglés), el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST, por sus siglas en inglés) y la amígdala y por una amplia variedad de neurotransmisores entre los que destacan el glutamato, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la noradrenalina y por neuropéptidos como la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la arginina vasopresina (AVP) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP). Recientemente se ha descrito que los cambios en la expresión de PACAP se correlacionan con el desarrollo del TEPT y se ha comenzado describir el papel de PACAP en los circuitos del estrés, el cual entre otras funciones, contribuye al mantenimiento de la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) y a la modulación de la liberación de otros mediadores como el CRH y el glutamato (Agarwal, Halvorson, & Legradi, 2005; Hammack et al., 2010; Mustafa, 2013).

Así, en el apartado 2 se abordan los antecedentes del presente trabajo, en él se incluyen: la neurobiología del miedo, el estrés y la ansiedad, la evaluación de conductas tipo ansiedad

en roedores y el papel de PACAP en la expresión de estas. En el apartado 3 se explica la justificación de este trabajo. En el apartado 4 y 5 se encuentran los objetivos e hipótesis respectivamente. Mientras que en el apartado 6 se describe el método que se siguió para dar respuesta a la hipótesis planteada. En el apartado 7 se encuentran descritos los resultados derivados de los experimentos realizados y por último en el apartado 8 y 9 se discute y se sintetizan las principales conclusiones del presente trabajo.

2. Antecedentes

2.1 Neurobiología del miedo, la ansiedad y el estrés.

2.1.1 Definiciones

Las emociones son respuestas adaptativas (fisiológicas, conductuales y mentales) ante un estímulo (externo o interno) que favorecen la supervivencia del organismo (Imbir, 2016), entre ellas destaca el miedo y la ansiedad las cuales pueden facilitar que se desencadene la respuesta de estrés que mantiene la seguridad y el bienestar del organismo (Sylvers, Lilienfeld & LaPrairie, 2011). Tanto el miedo como la ansiedad comparten similitudes funcionales y estructurales que han llevado a confusiones conceptuales e incluso a veces se les considera conceptos equivalentes (Fink, 2016), sin embargo hay rasgos que los diferencian y por lo cual es pertinente definirlos.

Un ejemplo de estas diferencias son los estudios correlacionales hechos en humanos, los cuales, por medio de auto-reportes, han observado que el miedo se correlaciona negativamente con la percepción de dolor, es decir, a menor percepción de dolor mayor es el sentimiento de miedo, mientras que los auto-reportes de ansiedad se relacionan

positivamente con la percepción del dolor, a mayor percepción de dolor aumenta el sentimiento de ansiedad (Rhudy & Meagher, 2000). De estos estudios se conceptualiza al miedo como una emoción que motiva los comportamientos de escape o lucha y a la ansiedad como una emoción que motiva la hipervigilancia y la evitación pasiva (Rhudy & Meagher, 2000). Los estudios clínicos de auto-reporte son el medio más directo para acceder al estado emocional, ya que involucran el componente subjetivo del contenido emocional de una persona, sin embargo, dificultan el uso de estos conceptos en estudios con animales no humanos, por lo cual, en estudios con modelos se opta por la medición de variables fisiológicas y conductuales asociados a estas emociones. Otros autores como Haglund y colaboradores en 2007 han contribuido a ello y han definido al miedo como una emoción aversiva que es provocada por la percepción de un estímulo de peligro específico, y este puede ser condicionado o no. Siendo específicos los mamíferos muestran principalmente tres respuestas conductuales de miedo: la lucha, el escape y la congelación (Sylvers et al., 2011) y por otro lado, la ansiedad se define comúnmente como una respuesta de hipervigilancia y evitación prolongada como forma de anticipar una amenaza (Craske et al., 2009).

Se puede observar que tanto las definiciones clínicas como las biológicas son complementarias, dado que consideran que ambas emociones tienen una valencia negativa pero se diferencian conductualmente en la dirección del comportamiento, ya que, en el miedo están encaminadas a escapar del estímulo peligroso mientras que en la ansiedad se dirigen a la aproximación, vigilancia y evaluación de estímulos potencialmente peligrosos (Calhoun & Tye, 2015). La otra diferencia a destacar es que el miedo se presenta ante un

estímulo que amenaza al organismo mientras que la ansiedad se presenta en ausencia de esta amenaza (Tovote, Fadok & Lüthi, 2015).

Hay un tercer fenómeno que está estrechamente relacionado con el miedo y la ansiedad: el estrés, que se considera como toda respuesta inespecífica del cuerpo ante cualquier demanda ambiental (Mora, Segovia, Del Arco, De Blas, & Garrido, 2012). Esta respuesta se lleva a cabo por dos sistemas interrelacionados: el sistema simpático adreno-medular (SAM) y el HPA (Gunnar & Quevedo, 2007). Ante un estresor, el SAM se activa liberando adrenalina, permitiendo así la movilización de energía y el despliegue de respuestas de “lucha o huida” (Shin & Liberzon, 2010). Mientras que el HPA desencadena la liberación de glucocorticoides en el torrente sanguíneo los cuales participan en la gluconeogénesis (Brinks, Berger, Gass, de Kloet, & Oitzl, 2009). Partiendo de esta definición de estrés, como el conjunto de respuestas ante las demandas ambientales; tanto miedo y ansiedad forman parte del espectro de respuestas que el sistema despliega para adaptarse al medio y que en gran medida dependen de la naturaleza del estresor y el contexto en que se presentan. (Bains, Cusulin & Inoue, 2015).

2.1.2 Neurobiología del estrés: Diferencias entre miedo y ansiedad

Como ya se ha mencionado la respuesta de estrés es llevada a cabo por dos sistemas relacionados entre sí: el SAM y el eje HPA (Gunnar & Quevedo, 2007). Cuando percibimos algún estímulo como “potencialmente” peligroso la amígdala lo evalúa y compara con los estados y experiencias previas del organismo (Fink, 2017), entonces manda esa información a núcleos del hipotálamo y del tronco cerebral los cuales activan el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) y a través del SAM (ganglios paravertebrales y prevertebrales) se desencadena una liberación rápida de las catecolaminas, noradrenalina y

adrenalina; estos neurotransmisores cumplen diversas funciones, tales como aumentar el gasto cardíaco y la presión arterial, desviar la sangre de la piel y los intestinos hacia los músculos esqueléticos y desencadenar la liberación de glucosa en el torrente sanguíneo, lo cual facilita las respuestas de lucha o huida (Ellis & Del Giudice, 2014; Mora et al., 2012). A la par, el sistema nervioso activa el eje HPA que da como resultado la liberación de glucocorticoides suprarrenales, cortisol en humanos, y corticosterona en roedores, los cuales mejoran la resistencia del organismo y la adaptación (Dedovic, Duchesne, Andrews, Engert, & Pruessner, 2009; Mora et al., 2012), además de modular la producción de prostaglandinas y citoquinas inflamatorias que inhiben la respuesta inmune y la inflamación (Czéh & Fuchs, 2016; Sorrells, Caso, Munhoz, & Sapolsky, 2009).

Los glucocorticoides en el cerebro se unen a dos receptores: uno de alta afinidad (MR) y otro de baja afinidad (GR) los cuales se expresan en altas proporciones en hipocampo (CA1 y CA3, amígdala (BLA y CeA), regiones de la corteza prefrontal (ventromedial) y el hipotálamo (PVN) y cuyas acciones pueden dividirse en inmediatas y persistentes (McEwen, 2016; Roozendaal, McEwen, & Chattarji, 2009). En las acciones inmediatas una vez que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), los glucocorticoides llegan a regiones como el hipocampo, la amígdala y el núcleo paraventricular de hipotálamo (PVN) (coordinador primario de la respuesta de estrés), donde retroalimentan negativamente al eje HPA, inhibiendo principalmente la síntesis y CRH lo cual modula a la baja la respuesta de estrés (figura 1) (Bains, Cusulin, & Inoue, 2015; McEwen, 2009).

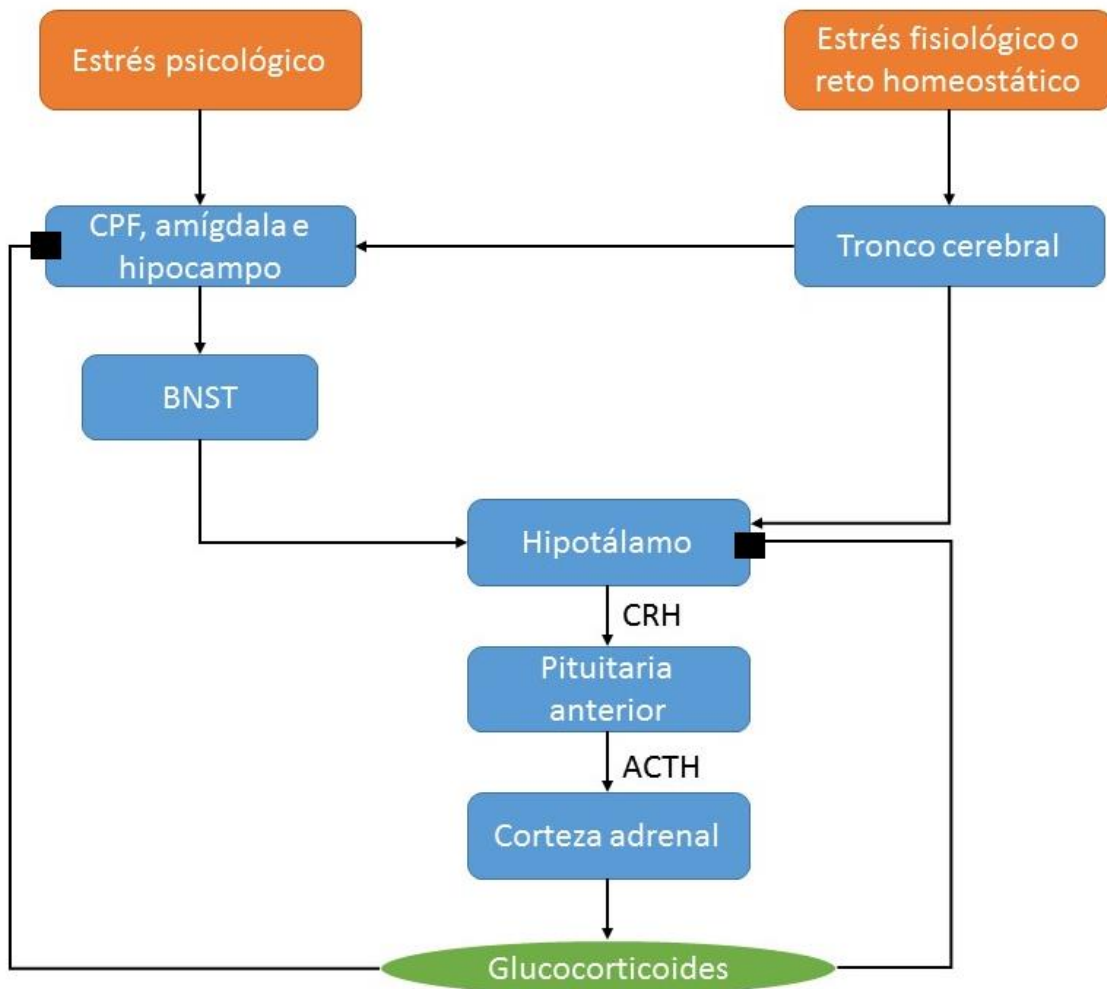


Figura 1. Respuesta fisiológica de estrés. Se observa el Eje HPA, compuesto por el hipotálamo, la pituitaria anterior y la corteza adrenal así como sus hormonas efectoras: factor liberador de corticotropina (CRH), hormona corticotropina (ACTH) y glucocorticoides. Los cuadrados en color negro representan la acción de los glucocorticoides en la retroalimentación negativa, hacia el hipotálamo la CPF, la amígdala y el hipocampo. Imagen modificada de Bains et al., 2015.

Por otra parte, las acciones persistentes de los glucocorticoides se deben a la activación sostenida de los GR lo cual se ha correlacionado con cambios morfológicos en hipocampo, corteza prefrontal y amígdala principalmente (Chattarji, Tomar, Suvrathan, Ghosh, & Rahman, 2015; Lupien, Maheu, Tu, Fiocco, & Schramek, 2007). Tanto en la corteza prefrontal como en el hipocampo se observa atrofia de las dendritas, pérdida de las espinas

dendríticas, disminución de la capacidad para inducir LTP así como reducción en la neurogénesis en el caso del hipocampo (Roosendaal et al., 2009; Sherin & Nemeroff, 2011). Mientras que en la amígdala se observa lo contrario; crecimiento de las dendritas, formación de espinas dendríticas y se facilita la LTP (Admon, Milad, & Hendler, 2013). Estudios con roedores han observado que estos cambios se correlacionan con una mayor respuesta ante estresores posteriores, deficiencias en la extinción (desaparición gradual de una conducta) y estados sostenidos de hipervigilancia (Lebois, Wolff, & Ressler, 2016; Sherin & Nemeroff, 2011).

Tanto los cambios en la respuesta fisiológica de estrés como las modificaciones morfológicas y funcionales observadas a largo plazo repercuten en las conductas típicas que ya hemos descrito con anterioridad. Las diversas clasificaciones permiten categorizarlas en 2 grupos: 1) las respuestas de afrontamiento y 2) las respuestas defensivas (Blanchard & Blanchard, 2008) o bien como 1) conductas tipo-ansiedad y 2) conductas tipo- miedo por la validez aparente que tienen en comparación a la respuesta en humanos en condiciones similares y el estado emocional asociado a ellas (Cryan & Holmes, 2005). Estas respuestas emocionales implican ajustes fisiológicos diferenciales y circuitos neurales asociados que se describirán a continuación. (Dantzer, 2016).

En principio el que se desencadene una u otra respuesta depende de la evaluación del contexto, si el peligro es inminente por lo general se despliegan respuestas defensivas como el escape y la lucha, tipificadas como respuestas tipo- miedo, los correlatos fisiológicos a estas son: el aumento en la frecuencia cardíaca, la vasoconstricción visceral y la vasodilatación muscular (Blanchard & Blanchard, 2008). Mientras que los circuitos neurales asociados incluyen un aumento en la transmisión glutamatérgica entre el hipocampo

ventral (VH, por sus siglas en inglés), la amígdala basolateral (BLA, por sus siglas en inglés), la corteza pre-límbica (PL, por sus siglas en inglés) y una disminución de esta transmisión excitatoria en las proyecciones de la amígdala central (CeA, por sus siglas en inglés) hacia la sustancia gris periaqueductal (PAG por sus siglas en inglés) y el PVN (Tovote et al., 2015). La tabla 1 resume los correlatos asociados a cada grupo de conductas.

Tabla 1. Comportamientos relacionados con el estrés y sus correlatos asociados

Categoría	Comportamiento	Correlatos fisiológicos asociados	Áreas cerebrales asociadas
Conductas defensivas o tipo-miedo	Congelamiento	Aumento en la frecuencia cardíaca	Aumento de la transmisión excitatoria en: VH*, BLA*, PL*.
	Escape	Vasoconstricción visceral	Disminución de la transmisión excitatoria en: CeA*, PAG*, PVN*.
	Pelea	Vasodilatación muscular	
Conductas de afrontamiento o tipo-ansiedad	Evitación	Disminución de la frecuencia cardíaca	Aumento de la transmisión excitatoria en: VH*, BLA*.
	Vigilancia	Vasoconstricción de la cabeza	Aumento en la transmisión inhibitoria en: CeA*, BNST*, PVN*.
	Acicalamiento	Vasodilatación de las extremidades	

Nota *: Ir a apartado de abreviaturas (pag II).

Por otro lado las conductas de afrontamiento o tipo-ansiedad por lo general se despliegan cuando el peligro no está presente pero que hay elementos del contexto que lo hacen probable en un futuro cercano, estas incluyen respuestas pasivas como la evitación, activas como la vigilancia y el acicalamiento todas ellas orientadas hacia la orientación y evaluación del entorno (Sestakova, Puzserova, Kluknavsky & Bernatova, 2013, Tatem et

al., 2014). Algunos de sus correlatos fisiológicos incluyen la disminución de la frecuencia cardíaca, la vasoconstricción de la cabeza y la vasodilatación de las extremidades (Dantzer, 2016). Los circuitos neurales asociados a estas conductas incluyen un aumento en la transmisión glutamatérgica entre el VH y la BLA y un aumento en la transmisión inhibitoria en la CeA, el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST por sus siglas en inglés) y el PVN (Adhikari, 2014; Tovote et al., 2015). Cabe aclarar que particularmente en este tipo de conductas aún hay varios circuitos que no se han estudiado lo suficiente, tales como la relación funcional que tiene la amígdala y el BNST, donde se sabe que ambos participan en la evaluación de estímulos con valor emocional pero se desconoce de qué forma lo hacen y cuáles son los mediadores químicos para que esto se lleve a cabo (Gungor, Yamamoto, & Pare, 2015; Herrmann et al., 2016; LeDoux, 2017).

Otro aspecto a destacar del estrés son las diferencias entre sexos que se encuentran en la respuesta de ansiedad y de manera general todos los trastornos relacionados con el estrés, como la ansiedad y la depresión, son más frecuentes en las mujeres (Douma, Husband, O'Donnell, Barwin, & Woodend, 2005; Goldstein, Jerram, Abbs, Whitfield-Gabrieli, & Makris, 2010; Solomon & Herman, 2009), estas tienen el doble de probabilidades que los hombres de desarrollar este tipo de trastornos (Maeng & Milad, 2015). Así mismo los estudios con roedores encuentran diferencias en conductas tipo ansiedad evaluada con campo abierto donde las hembras muestran una respuesta sostenida en comparación a los machos (Tatem et al., 2014).

Las causas de estas diferencias aún no se saben, sin embargo, hay evidencia de dimorfismos en los cerebros de ambos sexos y de diferencias en el desarrollo que subyacen a estos

efectos (Ariza, De Oliveira, & Franci, 2014). Por ejemplo en roedores se han encontrado diferencias sexuales en la amígdala medial y el BNST hasta del 85% más grande en machos que en hembras (Hines, Allen, & Gorski, 1992), en humanos las diferencias en volumen solo se han encontrado en BNST (Allen & Gorski, 1990). Estudios más recientes han encontrado diferencias estructurales en la conexión entre corteza infra límbica y la BLA en machos con respecto a las hembras, donde una longitud dendrítica mayor correlaciona con menos conductas de congelamiento (Grüne, Roberts, Thomas, Ronzio, & Shansky, 2015) e incluso la respuesta ante manipulaciones optogenéticas en circuitos relacionados con la ansiedad es diferencial en machos y hembras (Li, Nakajima, Ibañez-Tallon, & Heintz, 2016).

Estas diferencias también podrían deberse al papel de las hormonas gonadales en estructuras como el PVN y la pituitaria anterior (Maeng & Milad, 2015), en especial se han descrito que durante la adolescencia estas hormonas afectan de manera diferencial la respuesta ante estresores (Ariza, De Oliveira, & Franci, 2014), también se ha descrito que los altos niveles de progesterona aumentan los niveles de cortisol y por ende la reactividad ante el estrés e incluso la memoria de estos eventos (Ertman, Andreano, & Cahill, 2011). Sin embargo en pruebas de extinción de memoria los altos niveles de estrógeno mejoran el desempeño (Glover, Jovanovic, & Norrholm, 2015) en consonancia con estos datos en roedores la variación del ciclo estral en hembras modifica la conducta en el laberinto en cruz elevado, especialmente durante el proestro muestran mayores conductas tipo-ansiedad (Marcondes, Miguel, Melo, & Spadari-Bratfisch, 2001). Por otra parte hay una menor variación de estas conductas en los machos lo cual se ha vinculado con efectos ansiolíticos o protectores de la testosterona (McLean, Asnaani, Litz, & Hofmann, 2011). En resumen,

en las hembras hay una mayor variación en la respuesta de estrés y en general muestran mayores conductas tipo ansiedad, como producto de múltiples factores hormonales y de desarrollo en comparación con los machos, los cuales muestran resistencia ante los estresores. Sin embargo, aún falta investigación que complete el cuadro de factores que influyen en estas diferencias.

2.1.3 Evaluación de conductas tipo-ansiedad en roedores

Para evaluar este rango de conductas antes descritas en modelos animales se han validado diversas pruebas, como puede observarse en la Figura 2, donde la evaluación de estrés incluye la medición de glucocorticoides en plasma y medidas fisiológicas del ritmo cardíaco, la respiración y la temperatura. Las conductas tipo-miedo se evalúan usando dos paradigmas: el condicionamiento al miedo y el sobresalto potenciado. Finalmente para evaluar las conductas tipo-ansiedad existe un amplio número de pruebas, de entre las que destacan aquellas que se basan en la etología, como las usadas en esta investigación (Calhoun & Tye, 2015). Tanto campo abierto como el laberinto elevado en cero son pruebas que aprovechan la tendencia natural de los roedores para evitar explorar espacios abiertos, novedosos e iluminados donde podrían ser más vulnerables a las amenazas ambientales. Por lo general en estas tareas los roedores con un fenotipo ansioso tienden a pasar más tiempo en las zonas cerradas u oscuras de la prueba en comparación con los controles, en ambas la exposición a la prueba dura 5 minutos y se compara el tiempo que pasan en los espacios abiertos “no seguros” con respecto a los espacios cerrados “seguros” (Belzung & Griebel, 2001; Cryan & Holmes, 2005). Cabe destacar que ambas pruebas (campo abierto y laberinto elevado cero) están ampliamente validadas tanto en

investigación con estrés como en investigación con ansiolíticos (Blanchard & Blanchard, 2008; Ennaceur, 2014; Tatem et al., 2014)

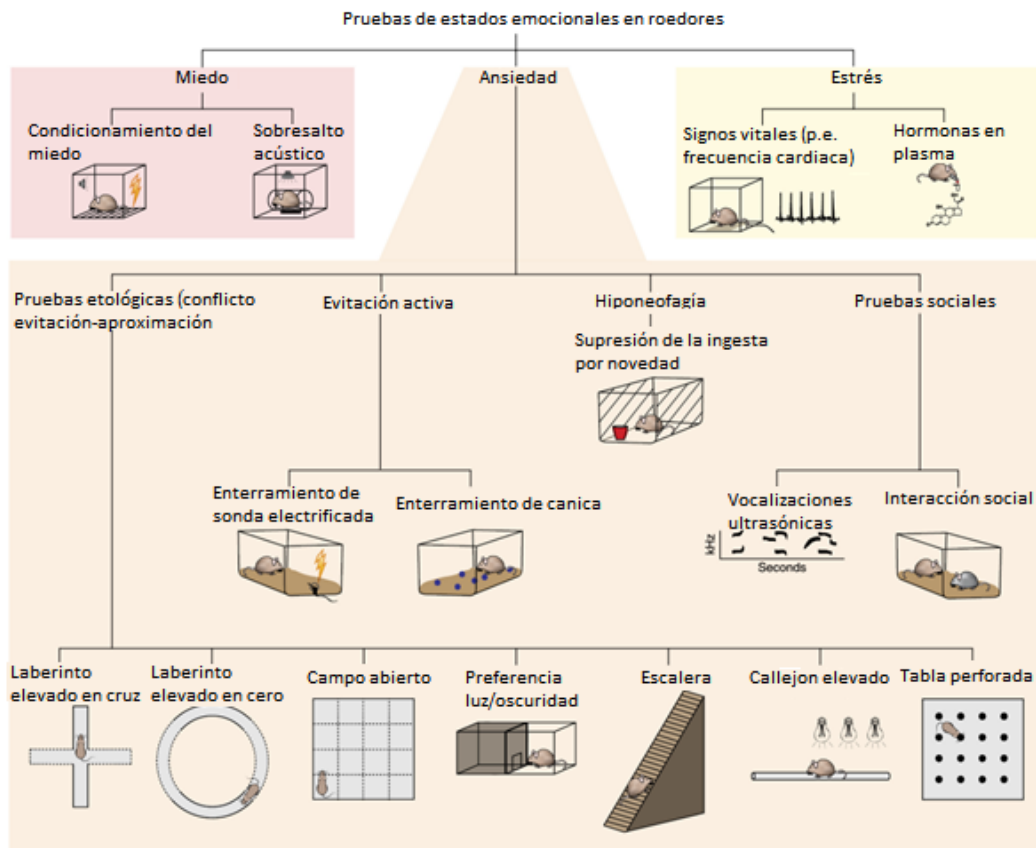


Figura 2. Pruebas conductuales para la evaluación de conductas tipo-miedo, estrés y tipo-ansiedad en roedores. Imagen modificada de Calhoon & Tye, 2015.

A razón de este estudio particular, en el laberinto elevado en cero (EZM por sus siglas en inglés) los ratones “ansiosos” evitan los brazos abiertos del laberinto y tienen una preferencia por los brazos cerrados. En la prueba de campo abierto (OFT por sus siglas en inglés), los animales “ansiosos” permanecen más tiempo en las orillas del área respecto al control y hay una disminución en la movilidad en general (Sestakova et al., 2013).

2.1.4 El papel de la amígdala en la respuesta de ansiedad

Las conductas tipo-ansiedad se despliegan en gran medida por circuitos que incluyen a la amígdala, estructura que está constituida por el complejo basolateral (BLA), el grupo de células intercaladas (ITC, por sus siglas en inglés) y CeA (Ehrlich et al., 2009; Roozendaal et al., 2009). La amígdala es un relevo en el procesamiento de información y recibe entradas sensoriales (talamo y corteza sensorial) a través de BLA (Pape & Pare, 2010; Schiller, Levy, Niv, LeDoux & Phelps, 2008), además de mantener una comunicación bidireccional con el hipocampo ventral y con regiones de la corteza prefrontal en humanos y corteza infralímbica y prelimbica en el caso de los roedores (Ledoux & Ledoux, 2000; LeDoux & Pine, 2016). Por esta conectividad que mantiene entre áreas sensoriales y áreas de información contextual como el hipocampo es que la amígdala está involucrada en la adquisición, almacenamiento y expresión de las conductas relacionadas a estímulos con valencia emocional (Janak & Tye, 2015). En general se ha descrito que BLA está más involucrada en la adquisición y aprendizaje de estímulos aversivos mientras que a CeA se le atribuye un papel en la expresión de conducta, al ser un núcleo de proyección hacia núcleos ubicados en el tronco encefálico y el hipotálamo (Duvarci & Pare, 2014; Gafford & Ressler, 2015; Martin, Ressler, Binder & Nemeroff, 2009) (Figura 3).

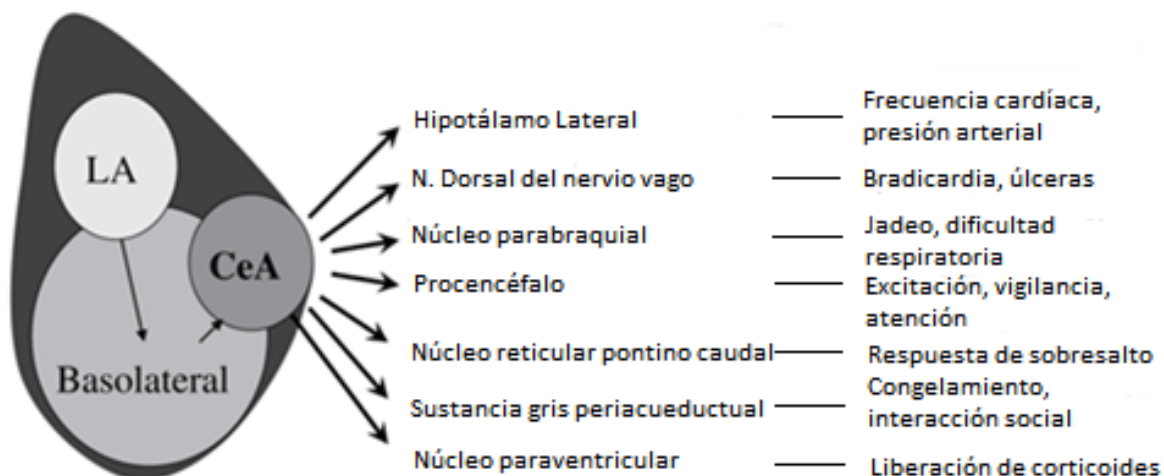


Figura 3. Principales proyecciones de la amígdala hacia núcleos del tronco cerebral y del hipotálamo así como los efectos conductuales y fisiológicos asociados a estas proyecciones. Modificado de Martin et al., 2009.

La evidencia que respalda el papel de la amígdala central en la expresión de las conductas tipo ansiedad es muy variada. Los estudios con lesión han descrito deficiencias en la expresión de estas conductas en la CeA (Roosendaal, Koolhaas & Bohus, 1991). Mientras que estudios más recientes han encontrado que una infusión intraamigdalina de CRH o PACAP promueve un aumento de conductas como la evitación inhibitoria y congelamiento, así como una reducción de estas conductas con una administración de antagonistas de los receptores CRH1 (Cho et al., 2012; Stamatakis et al., 2014). También se ha descrito que la actividad de CRH en CeA es necesaria para modular la adquisición y retención en ensayos de condicionamiento al miedo (Pitts & Takahashi, 2011). En relación al estrés se ha observado que 2 horas de estrés agudo por inmovilización en ratas son suficientes para provocar un aumento de corticosterona (CORT) y Glutamato en la amígdala así como cambios plásticos (crecimiento de las dendritas y espinogénesis) y estos cambios correlacionan con los datos conductuales del laberinto en cruz elevado (Roosendaal et al., 2009). Otros estudios han descrito que la actividad en CeA y BNST correlaciona con la

generalización de conductas tipo-ansiedad y con otros trastornos como las adicciones (Gilpin, Herman & Roberto, 2015; Partridge et al., 2016). Mientras que estudios con primates han encontrado que la sobreexpresión de CRF en amígdala aumenta su actividad y la expresión de conductas tipo-ansiedad (Kalin et al., 2016).

Por otro lado se sabe que los pacientes con daño amigdalino muestran déficits en la percepción del significado emocional ante caras de miedo y ante voces con tono emocional (Ledoux & Ledoux, 2000), mientras que pacientes con depresión o ansiedad muestran una mayor hiperactividad de la amígdala ante las mismas tareas (Martin et al., 2009). Por último, estudios más recientes han diferenciado que la actividad de la CeA y el BNST son un índice de un estado sostenido de ansiedad (Herrmann et al., 2016) y en conjunto tanto los datos experimentales como los clínicos han encontrado correlaciones entre los cambios estructurales y funcionales de la amígdala con cambios conductuales y con trastornos emocionales como la ansiedad generalizada y la depresión (Janak & Tye, 2015).

2.2 El rol del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria anterior (PACAP) en estrés y la ansiedad

Hasta aquí hemos descrito las respuestas que despliega un organismo ante estímulos ansiogénicos y los múltiples mediadores químicos que subyacen a estas. Recientemente la investigación en estrés y ansiedad se ha enfocado en PACAP debido a que en poblaciones psiquiátricas con trastornos relacionados con el estrés este péptido se encuentra a altas concentraciones en sangre ($> 20\text{pM}$) (Hammack & May, 2015; Shen, Gehlert & Collier, 2013). PACAP es un neuropéptido descubierto en 1989 que pertenece a la familia de

secretina / glucagón y en principio se aisló a partir de células de la pituitaria anterior donde se observó que tiene la función de estimular la acumulación de AMP cíclico (segundo mensajero) en neuronas y recientemente se encontró que también en astrocitos (Figiel & Engele, 2000; Iemolo, Seiglie, Blasio, Cottone & Sabino, 2016; Shen et al., 2013; Telegdy & Adamik, 2015). A partir del precursor (PRP) de este polipéptido se generan 2 formas bioactivas: el PACAP 38 y el PACAP 27 (38 o 27 aminoácidos, respectivamente). Sin embargo, el PACAP38 aparece aproximadamente de 10 hasta 100 veces más abundante en la mayoría de tejidos incluyendo el sistema nervioso central (Iemolo et al., 2016; Walker, Sundrum & Hay, 2014). Además está estrechamente relacionado con el Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) (68% de homología en la secuencia de aminoácidos) (Hashimoto et al., 2011). La estructura primaria tanto de VIP como de PACAP ha sido muy bien conservada en vertebrados, incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces (Li, Nakamachi & Arimura, 2006). Se expresa en una gran variedad de órganos y sistemas que van desde el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio, las glándulas adrenales, la tiroides, las gónadas, el tracto gastrointestinal, el páncreas, células del sistema inmune, el sistema nervioso, entre otros (Jolivel et al., 2009). Y por lo tanto ejerce efectos pleiotrópicos que incluyen la vasodilatación, la broncodilatación, la activación de la motilidad intestinal, el aumento de la insulina y la secreción de histamina, la modulación inmune y el control de la liberación de neurotransmisores (Kormos & Gaszner, 2013; Rudecki & Gray, 2016; Tanida et al., 2010)

2.2.1 Efectos fisiológicos

Las células del sistema nervioso central que lo expresan están ampliamente distribuidas en todo el encéfalo, pero de manera más específica PACAP está presente en numerosas áreas

del prosencéfalo relacionadas con el estrés, como el septum lateral, la amígdala central (CeA) y basolateral (BLA) y el BNST (Figura 4) (Hammack et al., 2010; Li, Nakamachi, & Arimura, 2006; Missig et al., 2014).

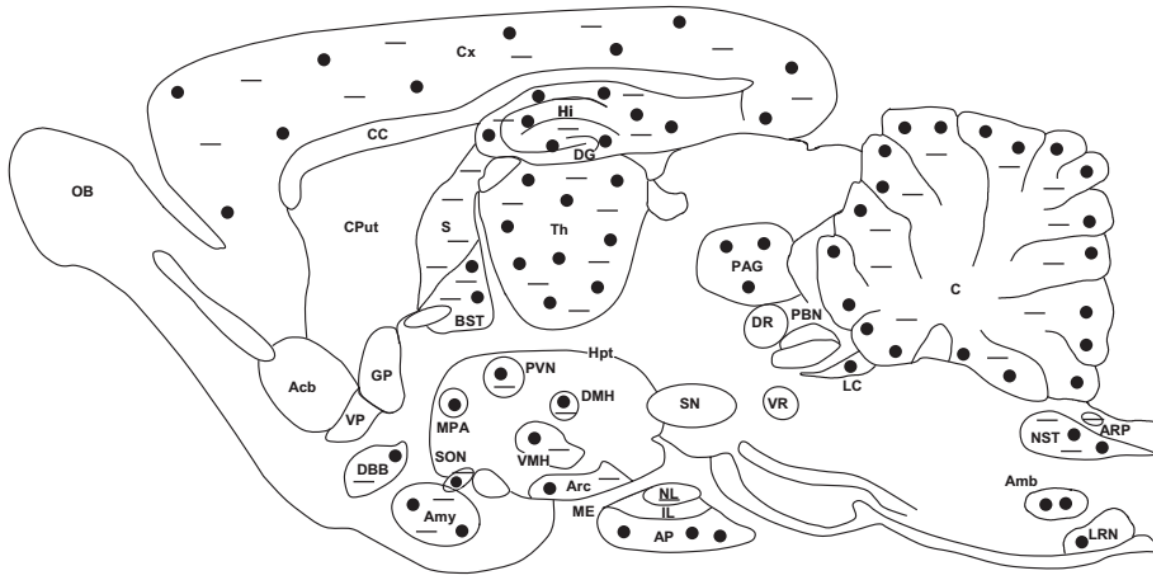


Figura 4. Localización de células (●) y fascículos (-) que expresan PACAP. Acb: núcleo accumbens; Amb: núcleo ambiguo; Amy: amígdala; AP: pituitaria anterior; Arc: núcleo arqueado del hipotálamo; BST: núcleo de la estría terminal; C: cerebelo; CC: cuerpo calloso; Cput: caudado putamen; Cx: corteza cerebral; DBB: banda diagonal de Broca; DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo; DR: núcleo del rafe dorsal; Hi: hipocampo; Hpt: hipotálamo; IL: lóbulo intermedio de la hipófisis; LC: locus coeruleus; LRN: núcleo reticular lateral; ME: eminencia media; NL: neuro hipófisis; NST: núcleo del tracto solitario; OB: bulbo olfatorio; PAG: sustancia gris periacueductal; PBN: núcleo parabraquial; PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo; S: septum; SC: núcleo supraquiasmático; SN: sustancia nigra; SON: núcleo supraóptico; Th: tálamo; VL: núcleo ventrolateral del tálamo; VM: núcleo ventromedial del tálamo; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; VPM: núcleo talámico ventroposteromedial. Imagen modificada de Vaudry et al., 2013.

PACAP se encuentra contenido en gránulos neurosecretorios y se libera desde estos sitios antes descritos para unirse a 3 receptores: VPAC1, VPAC2 y PAC1. Los primeros 2 tienen afinidad tanto para VIP como para PACAP, mientras que el PAC1 es específico a PACAP, y se caracteriza por ser un receptor metabotrópico de 7 dominios transmembranales acoplado a proteínas G α s o G α q, lo que lleva a la producción de AMP cíclico y a la actividad de la fosfolipasa C respectivamente (Dickson & Finlayson, 2009; Hazama et al., 2014). En el

cerebro de los roedores y los primates, estos receptores se localizan en altas concentraciones en estructuras como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el septum lateral, el hipocampo, el tálamo, el PVN, la sustancia negra, el BNST y la amígdala (Vaudry et al., 2009).

Una de las primeras evidencias de las acciones de PACAP fue descubrir que su presencia en PVN incrementa la síntesis y liberación de CRH en el PVN (Agarwal, Halvorson, & Legradi, 2005) y se han descrito resultados similares en otras áreas del cerebro que también expresan CRH, como lo son la amígdala y el BNST (Iemolo et al., 2016; Lezak et al., 2014; Meloni, Venkataraman, Donahue & Carlezon, 2016), estos mismos estudios además reportan un incremento en los niveles de corticosterona, por lo que la actividad de este polipéptido desencadena la respuesta del eje HPA manteniendo la secreción sostenida de CRH en el sistema nervioso en específico en áreas donde se coexpresa PAC1 Y CRH1 (Lezak et al., 2014; Stroth, Liu, Aguilera & Eiden, 2011). Además de mejorar la liberación de glucocorticoides, la administración central de PACAP también puede conducir a la activación simpática (Stroth, Holighaus, Ait-Ali & Eiden, 2011). Esto es posible ya que el PACAP también se encuentra en las neuronas simpáticas preganglionares de la médula espinal toracolumbar, y el efecto de PACAP en estas neuronas estimula la síntesis y liberación de catecolaminas suprarrenales (Eiden, 2013). Recientemente se han descrito que PACAP en CA1 y BLA es capaz de modular tanto la consolidación de la memoria de miedo como su extinción a través de su interacción con receptores tipo NMDA a través de procesos mediados por la proteína quinasa A (PKA) y proteína quinasa C (PKC) (Schmidt et al., 2015). Y en la línea de evidencia que demuestra que CRH en la amígdala es necesario para la consolidación y expresión de conductas tipo-ansiedad (Pitts & Takahashi,

2011; Shepard, Barron, & Myers, 2000, 2003), se ha descrito que PACAP modula tanto CRH como las sinapsis glutamatergicas en los circuitos intraamigdalinos (Cho et al., 2012).

Estos efectos de PACAP sobre el estrés y las conductas tipo-ansiedad, son complementados por estudios donde han observado que la exposición a estresores crónicos incrementan los niveles de PACAP y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) en estructuras como el BNST (Hammack et al., 2009) y por el contrario en estudios con ratones knockout de PAC1, han descrito una reducción de la expresión de Delta FosB, un factor de transcripción, en áreas del sistema límbico como la amígdala y del tronco encefálico, lo que implica una menor transcripción génica en estas areas (Kormos et al., 2016) y una reducción en la liberación de corticosterona (Lehmann, Mustafa, Eiden, Herkenham, & Eiden, 2013).

2.2.2 Efectos conductuales

La exploración de los efectos de PACAP en la conducta se pueden diferenciar en dos líneas de investigación: los estudios en ratones deficientes PACAP o de su receptor principal (PAC1) y por otra parte, los estudios de los efectos de una administración exógena de PACAP. En torno a los primeros estudios Gaszner y colaboradores (2012) describieron el fenotipo conductual de ratones deficientes de PACAP y encontraron que estos ratones muestran un incremento en la movilidad en el campo abierto respecto al control, así como un aumento en las conductas tipo depresión evaluadas por medio del nado forzado, donde estos ratones pasan más tiempo inmóviles respecto al control. Adicionalmente estos ratones muestran una reducción en conductas tipo ansiedad evaluadas por medio de los paradigmas de enterramiento de canicas y de preferencia de luz/oscuridad. Este perfil conductual correlaciona con menores niveles de glucocorticoides en hipocampo así como

un aumento en la expresión de c-fos en el BNST, el PVN y en la amígdala después de 30 min de la administración de PACAP lo que sugiere que esté activa las neuronas de estos núcleos y promueve la transcripción génica (Gaszner et al., 2012).

En esta misma línea de investigación se han descrito que estos ratones muestran conductas de salto e hiperactividad en el campo abierto, y menores conductas tipo-ansiedad en el laberinto en cruz elevado, a su vez hay una reducción de los metabolitos de la serotonina en la corteza y el estriado, lo que sugiere una respuesta del sistema serotoninérgico reducida (Hashimoto et al., 2001). Estos ratones deficientes de PACAP cuando son sometidos a estrés crónico no desarrollan conductas tipo-depresivas ni conductas tipo-ansiedad respecto a los controles evaluadas mediante pruebas de nado forzado, interacción social, campo abierto y laberinto en cruz elevado, además de presentar niveles bajos de CRH y corticosterona (Lehmann et al., 2013; Otto et al., 2001).

En lo que respecta a la evidencia de los efectos conductuales de la administración de PACAP algunos estudios muestran que la administración de 150/pmol de manera intracerebroventricular (icv) es suficiente para provocar un aumento en conductas tipo-ansiedad como las conductas de aseo y las sacudidas de pelo mojado, incluso con una dosis menor (100/pmol) también se han descrito aumentos en conductas tipo-ansiedad evaluadas mediante el laberinto elevado en cruz (Agarwal et al., 2005; Iemolo et al., 2016). Un estudio reciente ha descrito que la dosis de 100/pmol de PACAP aumenta la reactividad ante los estresores ambientales (Meloni et al., 2016). Investigaciones más recientes han observado que la administración (icv) de 100/pmol de PACAP no solo influye en la ansiedad sino también interrumpe la ejecución en la prueba de auto estimulación

intracraneal (ICSS) y la tarea de tiempo de reacción de 5 opciones (5CSRTT), tareas usadas para evaluar la motivación y la atención respectivamente (Donahue, Venkataraman, Carroll, Meloni & Carlezon, 2016). Para concluir con los estudios de administraciones intracerebroventriculares, se ha descrito que PACAP mimetiza las conductas tipo-depresivas evaluadas en el test de preferencia de sacarina y el nado forzado (Seigle, Smith, Blasio, Cottone & Sabino, 2015).

Por otra parte la administración en el PVN o en el núcleo central de la amígdala (CeA) disminuye la actividad motora (Missig et al., 2014; Norrholm, Das, & Légrádi, 2005), mientras que la administración en el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST, por sus siglas en inglés) produce un aumento en conductas tipo ansiedad evaluadas mediante el laberinto en cruz elevado y un aumento en las respuesta de sobresalto evaluadas mediante el condicionamiento al miedo (Dore et al., 2013; Hammack et al., 2009). Se ha observado que la administración en la amígdala central (CeA) provoca cambios de conductas activas a pasivas frente a estímulos estresores (Legradi et al., 2007). Si bien se han evaluado los efectos conductuales que tiene el PACAP en estructuras relevantes para las respuestas de estrés, los estudios no son concluyentes dada la variedad de efectos que tiene este polipéptido sugiriendo la necesidad de evaluaciones más comprensivas de los efectos conductuales.

3. Justificación

Se estima que la prevalencia de los trastornos relacionados con el estrés (entre los que se incluyen; las fobias, el trastorno de estrés postraumático y los trastornos de ansiedad) en la población adulta es del 18% con una prevalencia de por vida de más del 28% a nivel mundial (Calhoun & Tye, 2015) siendo las mujeres la población más afectada. Sin embargo, siguen sin ser suficientemente claros los sistemas de neurotransmisión que subyacen al desarrollo de estos trastornos y esto se ha traducido en deficiencias en el tratamiento farmacológico para estas afecciones. Por lo cual, es necesario el estudio sistemático de los mediadores químicos que se ven alterados en personas que sufren de estos trastornos. Diversos estudios sugieren que el aumento en la expresión del polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria anterior (PACAP) se correlaciona con el desarrollo de trastornos relacionados con el estrés. Por lo cual conocer el papel de este polipéptido en la respuesta de estrés entre sexos, en un modelo animal, es relevante para dilucidar donde reinciden las diferencias y qué papel juega PACAP con respecto a los mediadores clásicos de estrés.

4. Objetivos

4.1 General

Evaluar el efecto de la administración de PACAP en la amígdala central sobre conductas tipo ansiedad en ratas machos y hembras adultas.

4.2 Específicos

Conocer sí la administración de PACAP en la amígdala central afecta las conductas de congelamiento, evitación y exploración.

Comparar los efectos conductuales en machos y hembras de la administración de PACAP en la amígdala central.

Observar si la administración de PACAP en la amígdala central tiene efectos duraderos sobre la conducta.

5. Hipótesis General

La administración de PACAP en amígdala central (CeA) incrementará la expresión de conductas tipo-ansiedad en ratas machos y hembras adultas.

Específicas

La administración de PACAP en amígdala central (CeA) tendrá un efecto diferencial en ratas machos y hembras adultas.

La administración de PACAP en amígdala central (CeA) tendrá un efecto a largo plazo en las conductas tipo-ansiedad en ratas machos y hembras adultas.

6. Método

6.1 Sujetos

Se emplearon un total de 34 ratas de la cepa Wistar (18 hembras y 16 machos), las cuales pesaban entre 300 a 350 gramos al momento de llegar al bioterio de la Facultad de Psicología ubicado en el edificio B, planta baja. Se alojaron en cajas comunales (4 sujetos por caja) y se mantuvieron en un ciclo luz / oscuridad de 12:12 horas (las luces se encendían a las 8:00 a.m.), con alimento y agua disponibles ad libitum. Las ratas fueron manipuladas diariamente durante una semana antes de los procedimientos experimentales, los cuales se realizaron bajo los estándares de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.2 Cirugía estereotáxica

Para la cirugía estereotáxica se usó Pentobarbital sódico (25 mg/kg) como anestésico general administrado por vía intraperitoneal, Lidocaína (0.1 mg) como anestésico local y Atropina (0.2 mg/kg) como protector vagal para reducir las secreciones salivales y bronquiales así como para aumentar la frecuencia cardíaca. Se colocaron cánulas guía de acero inoxidable calibre 24 bilateralmente en el núcleo central de la amígdala (CeA), bajo las coordenadas: 2.4 a 2.6 mm Anteroposterior (AP) desde Bregma, \pm 4.4 a 4.5 mm. Lateral Medial (LM) y 5.5 a 5.6 mm Dorsal Ventral (DV) desde la superficie craneal (Paxinos & Watson, 2007). Las cánulas se sujetaron al cráneo con dos tornillos de acero inoxidable y cemento dental (R5V) y temporalmente ocluidos con una cánula falsa, las cuales se cambiaron diariamente para evitar que se taparan.

Después de la cirugía, se inyectó diclofenaco (5 mg / kg) por vía intramuscular para minimizar el dolor postquirúrgico y la inflamación. Antes de las evaluaciones conductuales se dejaron pasar 7 días de recuperación post quirúrgica durante los cuales se manipulaban y se cambiaban las cánulas falsas diariamente, los últimos 3 días de cuidados post cirugía se utilizó una tela para sujetar a las ratas y se habituaron al procedimiento de infusión. Las ratas se asignaron en cuatro grupos: dos grupos control (machos y hembras) y dos grupos experimentales (machos y hembras).

6.3 Fármacos

A los grupos control se les infundió solución salina estéril (100pmol), mientras que a los grupos experimentales se les infundió PACAP 1-38 (Tocris, Bristol, UK), diluido en solución salina estéril que contenía albúmina de suero bovino al 0.05% por medio de una cánula de administración calibre 31 de acero inoxidable que se colocó a 2.0 mm por debajo de la cánula guía, conectada a una micro jeringa Hamilton de 10 microlitros impulsada por una bomba de micro infusión marca Harvard Apparatus No. 70-4507. La cantidad de PACAP infundido fue de 100 pmol diluido en 1 μ l de vehículo a una tasa de 1 μ l / min. La cánula de infusión permaneció insertada durante 1 minuto después de la inyección para evitar el reflujo y para permitir la difusión del péptido. Después de esto la cánula interna fue retirada, el animal fue puesto en su caja hogar por 30 minutos y posteriormente pasaron a las pruebas conductuales.

6.4 Evaluación Conductual

Todas las evaluaciones conductuales se realizaron durante el período de luz del ciclo entre las 10:00 y las 14: 00 horas y el comportamiento de los animales fue grabado en video con

cámaras marca Microsoft HD-3000 en formato MP4 para su posterior análisis. Las pruebas conductuales elegidas fueron:

1. Campo abierto que permite evaluar la exploración de ambientes novedosos, la actividad locomotora general y conductas asociadas con la ansiedad producto de la novedad del entorno, desprotegido e iluminado, como lo son el acicalamiento y el congelamiento.
2. Laberinto en cero elevado que permite observar conductas relacionadas con la ansiedad y en el cual el animal tiene la opción de pasar tiempo en los brazos abiertos y sin protección o en los brazos cerrados y protegidos.

Todos los animales fueron evaluados en ambas pruebas conductuales, las cuales fueron contrabalanceadas para evitar que la seriación de las pruebas fuera una variable que influyera en la respuesta. Se realizó una primera evaluación inmediata a la administración farmacológica y una segunda evaluación 5 días después con el objetivo de observar si los efectos eran agudos o persistían en el tiempo. Todas las especificaciones técnicas así como la descripción de las conductas a observar se describen a continuación para cada una de las pruebas conductuales.

6.4.1 Campo Abierto

Consiste en una caja de acrílico de 98 cm de largo, 100 cm de ancho y 50 cm de altura, cuya superficie se dividió en 16 cuadrantes de iguales dimensiones y se ilumina con luz amarilla de 23 watts (Figura 5). La prueba comienza colocando el sujeto al centro del área durante 5 minutos después de los cuales se limpia el área con un desinfectante general para

reducir los olores presentes. Dentro de esta prueba se consideraron los siguientes parámetros conductuales a observar:

Tiempo de permanencia en el centro y en la periferia.

Cruces: 50% o más del cuerpo del animal cruza por un cuadrante. Se registraron los cruces en la periferia y en el centro del campo abierto.

Erguimiento: Elevación sobre sus cuartos traseros.

Acicalamiento: movimiento de los cuartos delanteros y traseros auto dirigidos.

Congelamiento: ausencia total de movimiento mayor a 2 segundos.

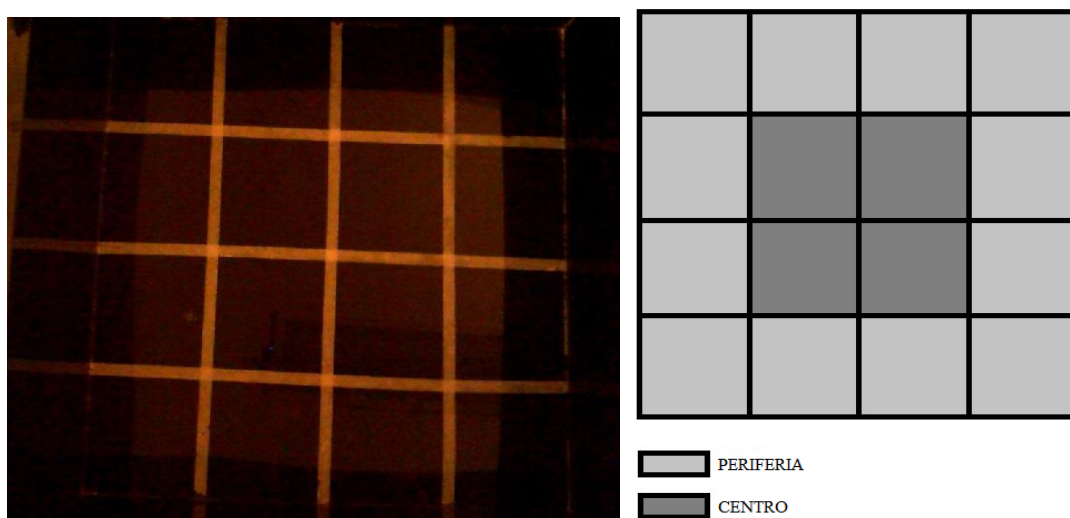


Figura 5. Campo abierto. Esquema representativo donde se delimitan los cuadrantes del centro y la periferia (Derecha), caja de campo abierto con la iluminación utilizada en las evaluaciones perteneciente al Laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal (Izquierda).

6.4.2 Laberinto Cero Elevado

El laberinto tiene una superficie opaca y de color azul oscuro con un diámetro exterior de (116, 8 cm), tiene un par de brazos abiertos y un par de brazos cerrados que se encuentran opuestos entre sí, las paredes de los brazos cerrados tienen una longitud de 20.5 cm. y la elevación desde el suelo es de 64 cm. Con una iluminación de luz blanca de 60 watts

(Figura 6). La prueba comienza colocando al sujeto al centro de alguno de los brazos cerrados por 5 minutos después de los cuales se limpia el área para reducir los olores presentes. Para esta prueba se consideraron los siguientes parámetros a observar:

Tiempo de permanencia en segundos en brazos abiertos.

Número de entradas a brazos abiertos.

Evaluación del riesgo: la cabeza o dos patas del animal están fuera de alguno de los brazos

Cerrados y explora hacia el brazo abierto.

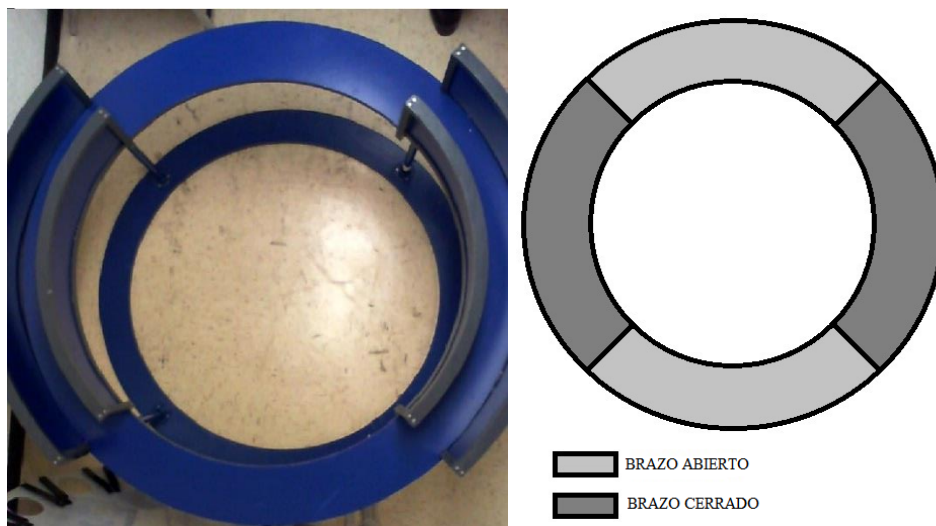


Figura 6. Laberinto Cero Elevado. Esquema representativo donde se indican los brazos abiertos y cerrados (Derecha). Foto de laberinto elevado perteneciente al Laboratorio de Neuropsicofarmacología y Estimación Temporal (Izquierda).

6.5 Verificación de colocación de cánulas

Al concluir con las evaluaciones conductuales se prosiguió a la obtención de cerebros de todos los animales mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% en agua destilada. Se les administró Pentobarbital sódico (50mg/kg) por vía intraperitoneal como anestésico general y cuando las ratas estaban completamente sedadas se les administró 1 μ l

de azul de metileno por cada sitio de canulación para verificar los sitios de inyección, una vez hecho esto se expuso la cavidad intracardiaca. Posteriormente se hizo pasar solución salina al 0.9% a través de una cánula colocada en el ventrículo izquierdo del corazón y una vez que salió toda la sangre, se hizo pasar paraformaldehído para la fijación del tejido. Posterior a la fijación, los cerebros fueron sacados del cráneo y dejados en post fijación con paraformaldehido, para posteriormente hacer cortes coronales en vibratomo y verificar los sitios de inyección, tomando como referencia el atlas de coordenadas estereotáxicas para cerebro de rata de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 2007). Los animales en los cuáles las cánulas no quedaron colocadas en CeA fueron excluidos del análisis estadístico. Abajo puede observarse el esquema general del experimento completo (Figura 7).

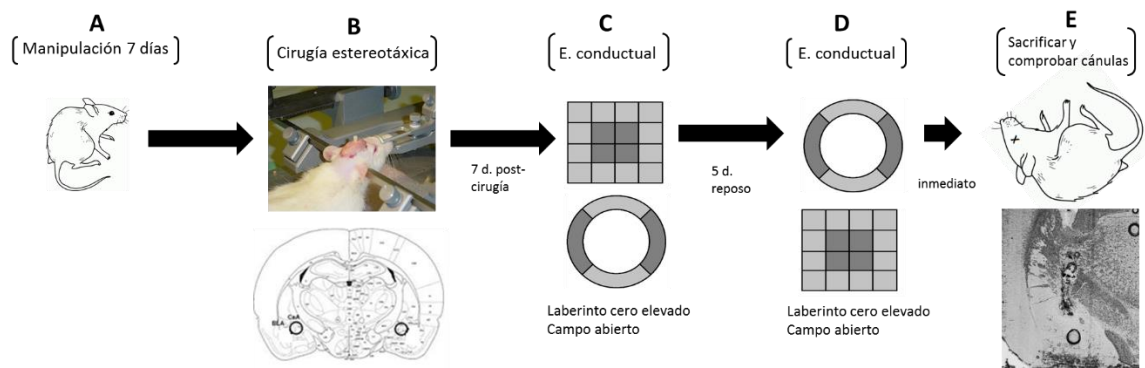


Figura 7. Esquema representativo de la manipulación experimental a la que se sometieron los sujetos.

6.6 Análisis estadístico

Se utilizó el software SigmaPlot 11.0 para realizar todos los análisis estadísticos. Tanto para la comparación de las conductas realizadas en el laberinto cero elevado como en el campo abierto se realizó un ANOVA de dos vías, teniendo como factores al sexo (hembras

o machos) y al tratamiento (sham o PACAP) para la primera evaluación. De igual forma, para la comparación de ejecución en la segunda evaluación, se realizó un ANOVA de dos vías con los mismos factores antes mencionados. Las comparaciones post-hoc se llevaron a cabo con el test de Tukey.

Para comparar la ejecución entre la primera y segunda evaluación en las pruebas conductuales antes mencionadas, se realizó una prueba T de student para muestras relacionadas para cada uno de los grupos (sham hembras, PACAP hembras, sham machos y PACAP machos) que tenían una distribución normal o una prueba no paramétrica de rangos con signo de Wilcoxon para las distribuciones que no pasaron la prueba de normalidad.

7. Resultados

7.1 La administración de PACAP en CeA induce conductas tipo-ansiedad en machos y hembras evaluadas en laberinto cero elevado.

Los animales a los que se les administro PACAP mostraron una reducción en el tiempo que pasaron en los brazos abiertos en comparación a los grupos sham, por lo tanto se vio un efecto del tratamiento ($F [3,34]= 17.558, p<0.050$) lo cual fue consistente en la segunda evaluación ($F [3,34]= 13.892, p<0.050$). Las comparaciones post-hoc mostraron diferencias significativas en la ejecución de las ratas PACAP hembras y PACAP machos con sus respectivos grupos sham como puede verse en la figura 8A y 8B. Sin diferencias significativas entre sexo, tampoco se observaron cambios significativos intra grupo al comparar la ejecución de la primera evaluación con la segunda.

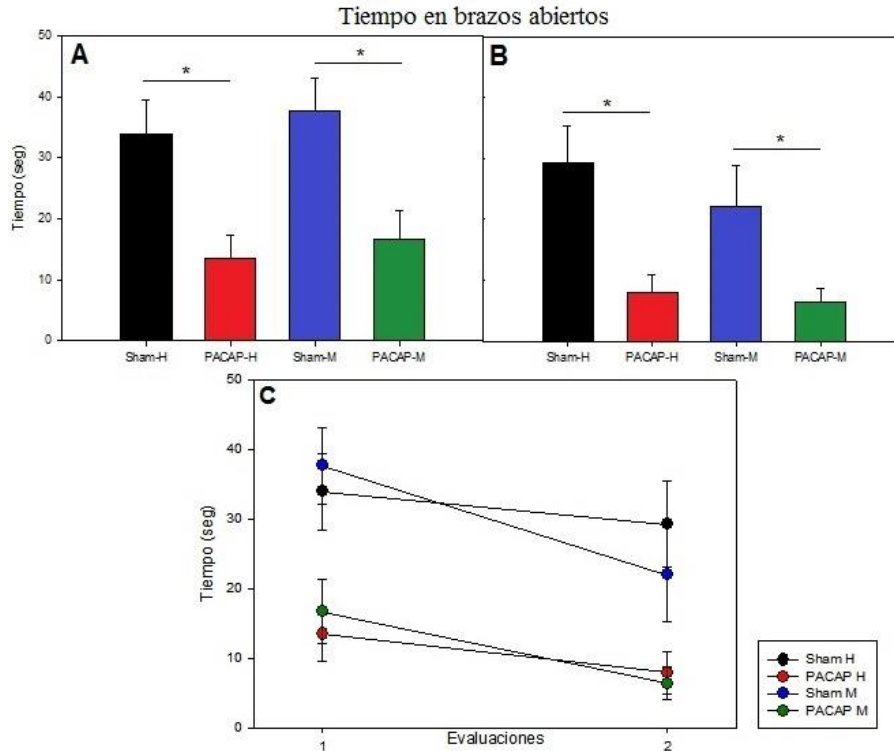


Figura 8. Tiempo en los brazos abiertos del laberinto cero elevado. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde). Se observa un efecto del tratamiento, que es consistente en la segunda evaluación como puede observarse en el panel B. En el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($p<0.050$).

En relación a las entradas a brazos abiertos, en la primera evaluación se observó un efecto del tratamiento ($F [3,34]= 6.994$, $p<0.050$) y las comparaciones post-hoc mostraron diferencias entre el grupo sham hembras y PACAP hembras, donde este último grupo tuvo un menor número de entradas hacia el brazo abierto, esta reducción se mantuvo en la segunda evaluación ($F [3,34]= 11.530$, $p<0.050$) con diferencias entre el grupo sham hembras y PACAP hembras y entre el grupo sham machos y PACAP machos de acuerdo a la comparación post-hoc, como se observa en la figura 9. No se encontraron cambios significativos entre la primera y segunda evaluación en ninguno de los grupos.

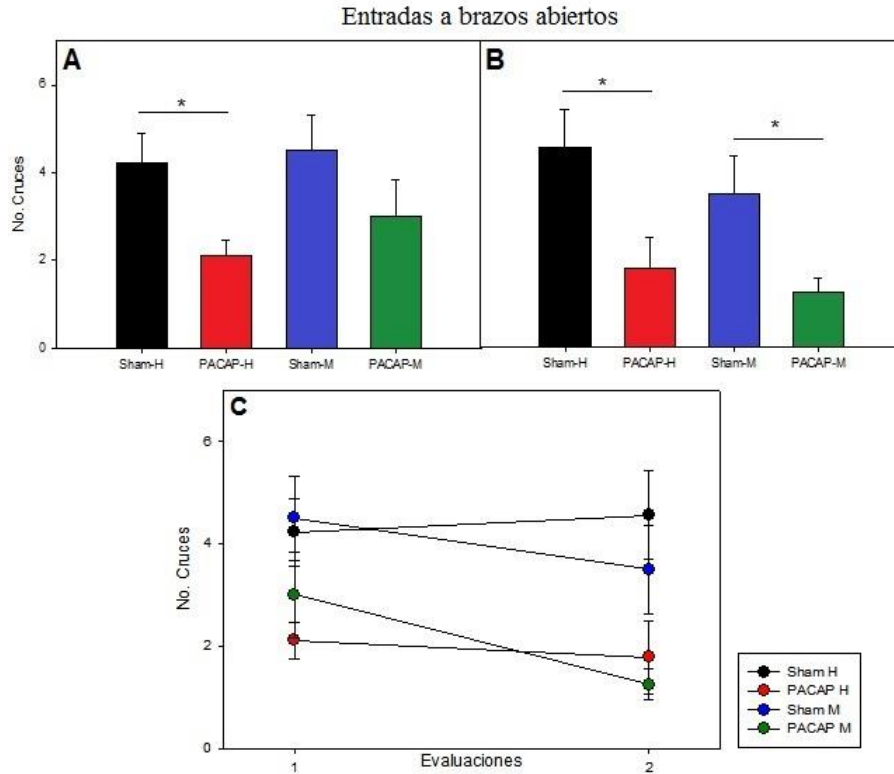


Figura 9. Cruces hacia los brazos abiertos del laberinto cero elevado. En el panel A se muestran las diferencias en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H (n=9) (negro), PACAP H (n=9) (rojo), Sham M (n=8) (azul), PACAP M (n=8) (verde). Solo se observa efecto del tratamiento en hembras. En el panel B se ve la comparación en la segunda evaluación con un efecto del tratamiento en machos y hembras. El panel C muestra las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P < 0.050$).

7.2 La administración de PACAP en CeA disminuye la actividad de evaluación de riesgo en hembras.

Las comparaciones de la frecuencia de evaluación de riesgo mostraron una interacción estadísticamente significativa entre el factor sexo y tratamiento ($F [3,34] = 6.209$, $p < 0.050$), las comparaciones post-hoc mostraron que estas diferencias significativas se dieron entre el grupo sham hembras y PACAP hembras y entre los grupos sham hembras y sham machos, donde se observó que el grupo sham hembras tiene una mayor frecuencia en conductas de evaluación de riesgo, cabe destacar que estas diferencias no se mantuvieron en el tiempo, dado que no hubo cambios significativos en la segunda evaluación, como se puede observar

en la figura 10. La comparación entre primera y segunda evaluación no mostro diferencias entre ninguno de los grupos.

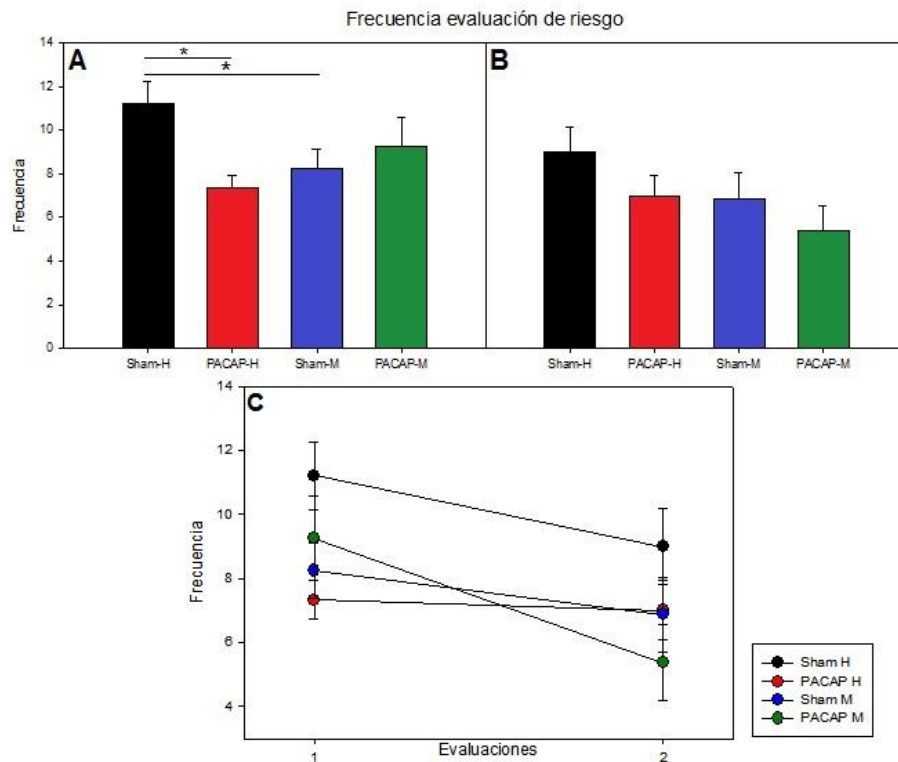


Figura 10. Frecuencia de evaluación de riesgo en el laberinto cero elevado. En el panel A se observa la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H (n=9) (negro), PACAP H (n=9) (rojo), Sham M (n=8) (azul), PACAP M (n=8) (verde). Hubo diferencias significativas entre los grupos sham (hembras y machos) y entre los grupos sham hembras y PACAP hembras. En el panel B se ve la ejecución en la segunda evaluación entre los grupos y en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P < 0.050$).

En el tiempo invertido en conductas de evaluación de riesgo durante la primera evaluación hubo un efecto del tratamiento ($F [3,34] = 12.157, p < 0.050$) y el análisis post-hoc mostro que la diferencia fue entre el grupo sham hembras y PACAP hembras, esta diferencia se mantuvo en la segunda evaluación ($F [3,34] = 8.106, p < 0.050$) y además se observaron diferencias entre sexos ($F [3,34] = 6.428, p < 0.050$) entre los grupos sham hembras y sham machos de acuerdo a la prueba post-hoc. En concordancia con la frecuencia de estas

conductas también se observa que el grupo sham hembras invierte una mayor cantidad de tiempo en estas conductas de evaluación de riesgos. Por último también se observó una reducción significativa en el tiempo en la evaluación de riesgo del grupo sham machos entre la primera y segunda evaluación ($t [1,9]= 3.392, p<0.050$). Todo lo anterior se puede observar de manera gráfica en la figura 11.

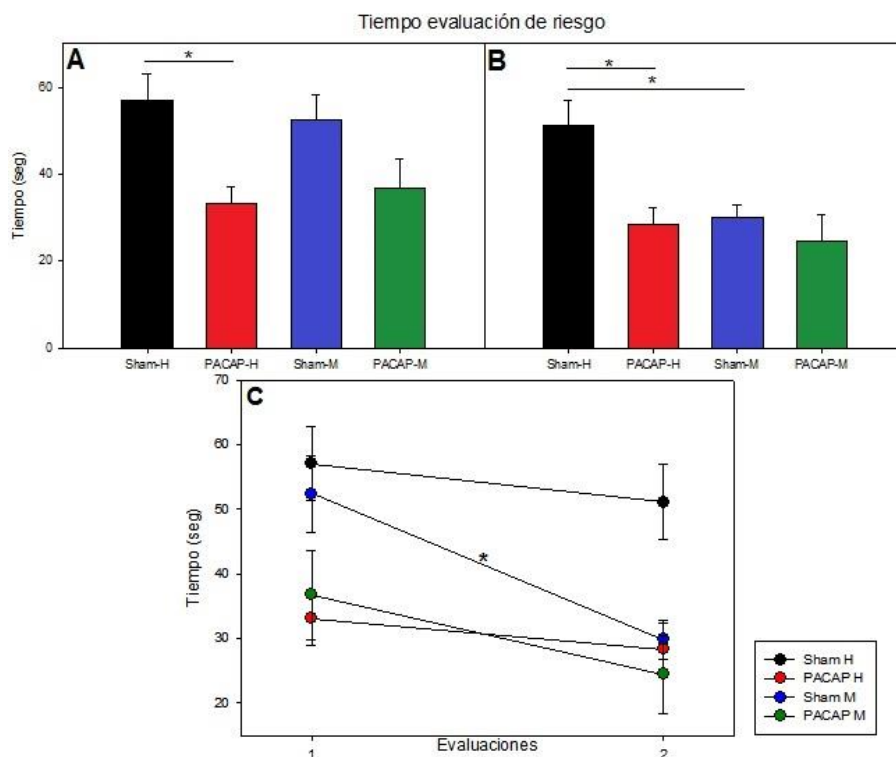


Figura 11. Tiempo de evaluación de riesgo en el laberinto cero elevado. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde). Hubo un efecto entre las hembras (sham y PACAP) consistente con la segunda evaluación como se ve en el panel B, también hubo diferencias entre los grupos sham (machos y hembras) solo en la segunda evaluación. En el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación con diferencias en el grupo sham machos. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P<0.050$).

7.3 La administración de PACAP en CeA disminuye la motricidad general en hembras.

En la primera evaluación se encontró una diferencia significativa entre el grupo PACAP hembras y sham hembras, donde se observa un aumento en el número de cruces del grupo sham, estadísticamente hubo una interacción entre los factores sexo y tratamiento ($F [3,34]= 5.872, p<0.050$) estas diferencias solo se observan en la primera evaluación, mientras que en la segunda se observan un efecto del tratamiento ($F [3,34]= 6.282, p<0.050$) entre los grupos sham de acuerdo al análisis post-hoc como puede verse en la figura 12.

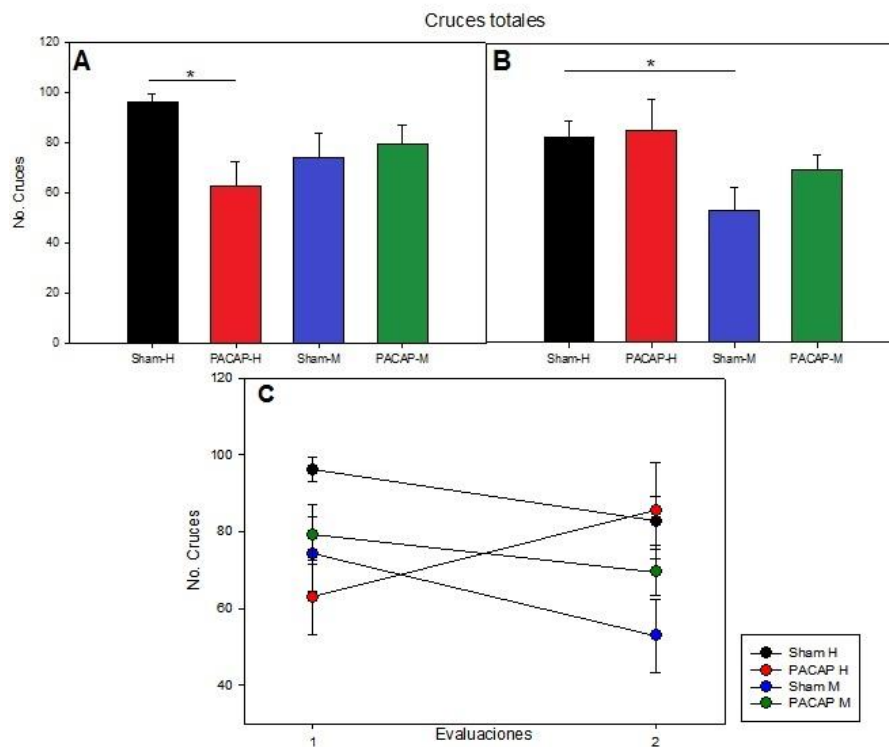


Figura 12. Cruces totales en campo abierto. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde). Se observan diferencias entre los grupos de hembras (sham y PACAP) mientras que estas diferencias se anulan en la segunda evaluación como se ve en el panel B, además se observa una diferencia entre los grupos sham (machos y hembras) solo en la segunda evaluación. En el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P<0.050$).

7.4 La administración de PACAP en CeA no afecta el número de cruces y el tiempo que pasan los animales en el centro del campo abierto.

Por otra parte en las comparaciones del número de cruces en el centro de campo abierto no hubo ninguna diferencia significativa en la primera y segunda evaluación. Sin embargo, el grupo sham machos mostro un cambio estadísticamente significativo entre la primera y segunda evaluación ($t [1,9]= 2.727, p<0.050$), esta comparación se puede observar en la figura 13C.

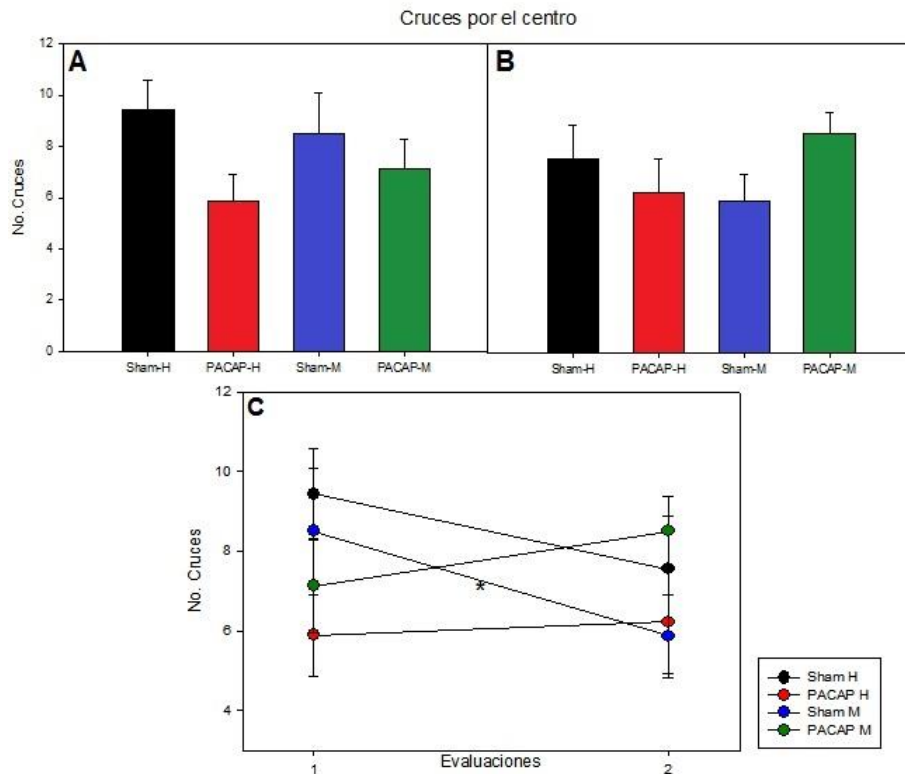


Figura 13. Cruces por el centro del campo abierto. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde). En el panel B se muestran las comparaciones en la segunda evaluación entre los grupos y en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación, donde hubo una diferencia significativa en el grupo sham machos. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P<0.050$).

En la figura 14 se pueden observar las comparaciones efectuadas del tiempo que pasaron los animales en el centro del campo abierto y como puede verse no hay ninguna diferencia significativa, sin embargo, es notorio que el grupo PACAP machos muestra un incremento

en el tiempo que pasa en el centro en la segunda evaluación respecto a su ejecución en la primera evaluación y respecto a los demás grupos.

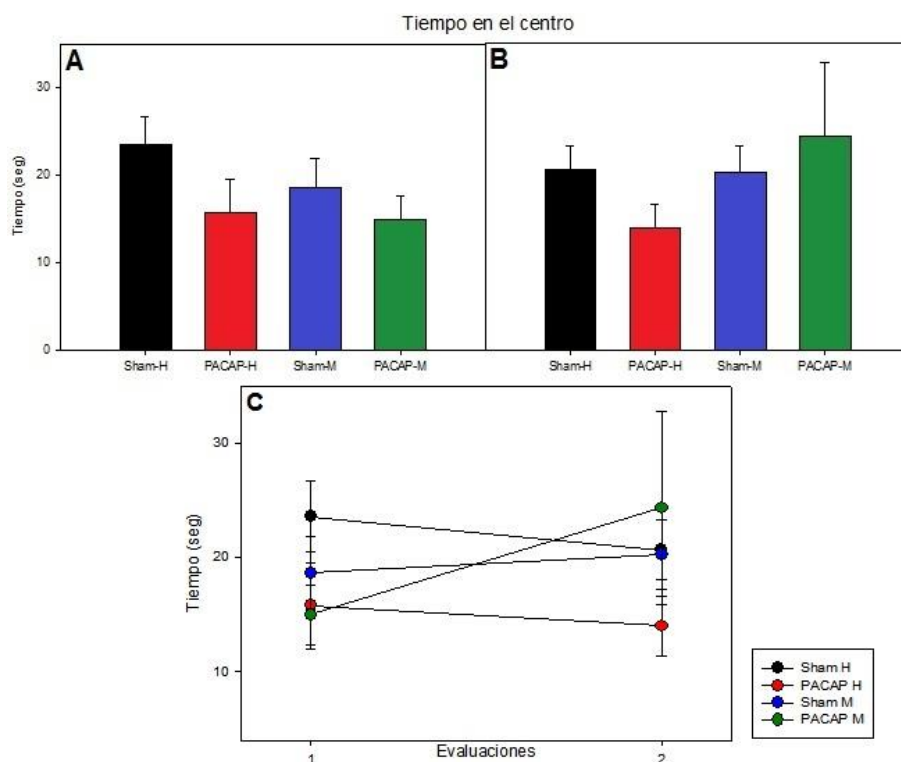


Figura 14. Tiempo en el centro del campo abierto. En el panel A se observa la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde), mientras que en el panel B se muestra la comparación en la segunda evaluación entre los grupos y en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P<0.050$).

7.5 La administración de PACAP en CeA aumenta la conducta exploratoria en machos y hembras.

Al comparar la frecuencia de la conducta de erguimiento entre los cuatro grupos del experimento no se encontraron diferencias significativas ni en la primera ni en la segunda evaluación. Sin embargo, como puede verse en la figura 15C los grupos sham (machos y hembras) mostraron una reducción significativa en la frecuencia de esta conducta al comparar su propia ejecución en la primera evaluación con respecto a la segunda, con

valores de ($t [1,9]= 3.180, p<0.050$) para el grupo sham machos y para el grupo sham hembras un valor de ($W= -21.000, p<0.050$) en la prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

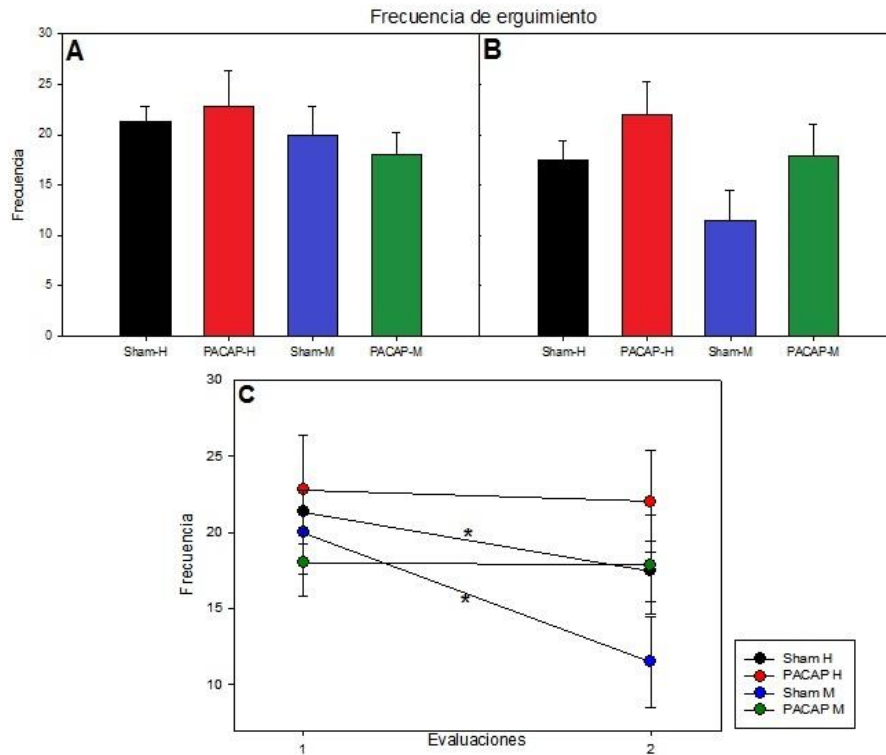


Figura 15. Frecuencia de erguimiento en el campo abierto. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H (n=9) (negro), PACAP H (n=9) (rojo), Sham M (n=8) (azul), PACAP M (n=8) (verde) mientras que en el panel B se muestra la comparación en la segunda evaluación entre los grupos y en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación donde hubo diferencias en los grupos sham hembras y sham machos. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P<0.050$).

Las comparaciones del tiempo de erguimiento en la primera evaluación mostraron un efecto diferencial del tratamiento con PACAP en machos y hembras ($F [3,34]= 4.524, p<0.050$), donde las hembras pasaron más tiempo en erguimiento que los machos, este efecto no se observó en la segunda evaluación, en la cual se observó que las hembras PACAP mantienen el tiempo de erguimiento elevado y los machos PACAP aumentaron el tiempo invertido en esta conducta de manera significativa respecto a su control ($F [3,34]= 7.118, p<0.050$) como puede observarse en la figura 16, donde también puede ver un efecto intra

grupo en el grupo sham machos que reduce su tiempo de erguimiento en la segunda evaluación en comparación a la primera de acuerdo a los valores de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon ($W = -21.000$, $p < 0.050$).

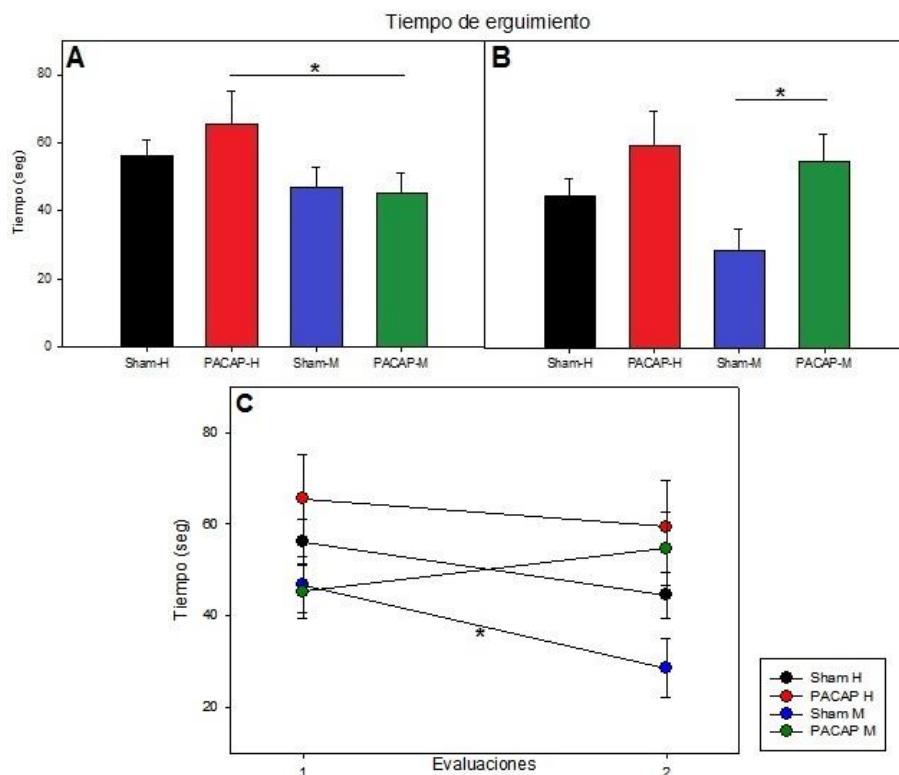


Figura 16. Tiempo de erguimiento en campo abierto. En el panel A se observa la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde) donde hubo un efecto diferencial de PACAP en hembras y machos, pero esta diferencia no se sostiene en la segunda evaluación como se ve en el panel B, también se observa una diferencia entre los machos (sham y PACAP). En el panel C se muestran las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación, donde se observa una diferencia en el grupo sham machos. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P < 0.050$).

7.6 La administración de PACAP en CeA aumenta la conducta de congelamiento en hembras.

En la figura 17 pueden verse las comparaciones de la frecuencia de congelamiento entre los cuatro grupos del experimento donde solo se observó una diferencia significativa en la primera evaluación entre los grupos de hembras (sham y PACAP) como efecto del

tratamiento ($F [3,34]= 16.743, p<0.050$). Por otra parte también hubo un efecto intra grupo en el grupo sham hembras que aumentaron su frecuencia de congelamiento en la segunda evaluación ($t [1,9]= -2.363, p<0.050$)

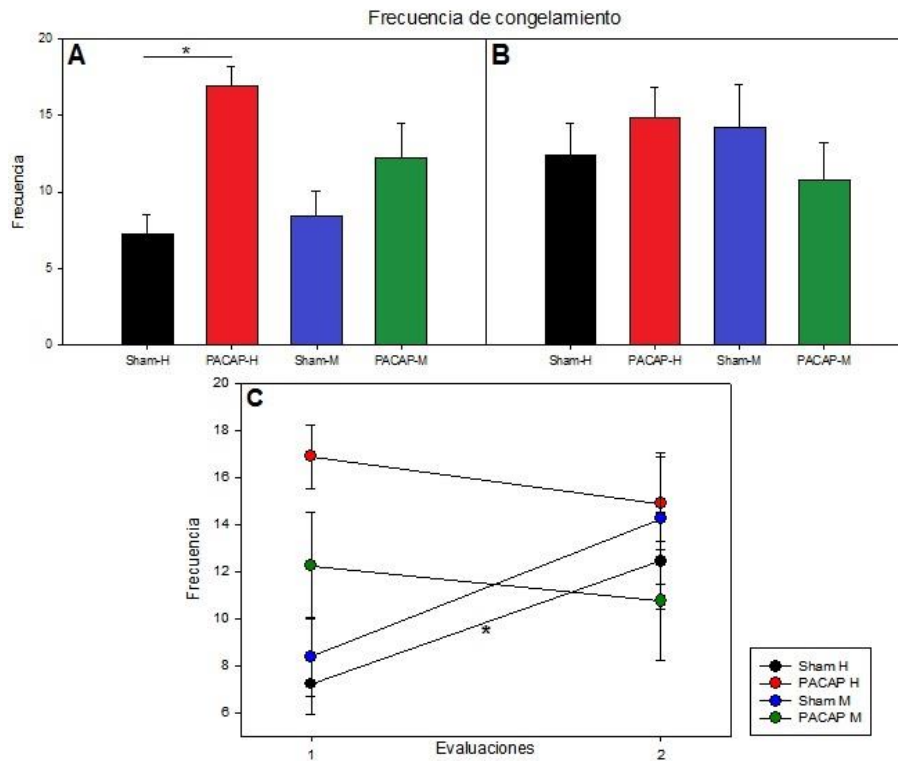


Figura 17. Frecuencia de congelamiento en campo abierto. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde) donde se ve una diferencia entre los grupos de hembras (sham y PACAP) pero esta diferencia no se sostiene en la segunda evaluación como se ve en el panel B. Por otra parte en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación con una diferencia en el grupo sham hembras. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: $*(P<0.050)$.

Por otro lado en las comparaciones del tiempo de congelamiento en la primera evaluación se encontró un efecto tanto del tratamiento ($F [3,34]= 24.228, p<0.050$) como del sexo ($F [3,34]= 16.282, p<0.050$), siendo las hembras PACAP las que pasan más tiempo en congelamiento respecto al grupo hembras sham y respecto al grupo machos PACAP como puede verse en la figura 18. Sin embargo, en la segunda evaluación ya no se encontraron

diferencias en el grupo de hembras y solo hubo diferencias entre el grupo hembras PACAP con machos PACAP ($F [3,34]= 5.805, p<0.050$). Por último se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el grupo sham hembra entre la primera y segunda evaluación ($t [1,9]= -2.386, p<0.050$) donde se observa un aumento en el tiempo invertido en la conducta de congelamiento.

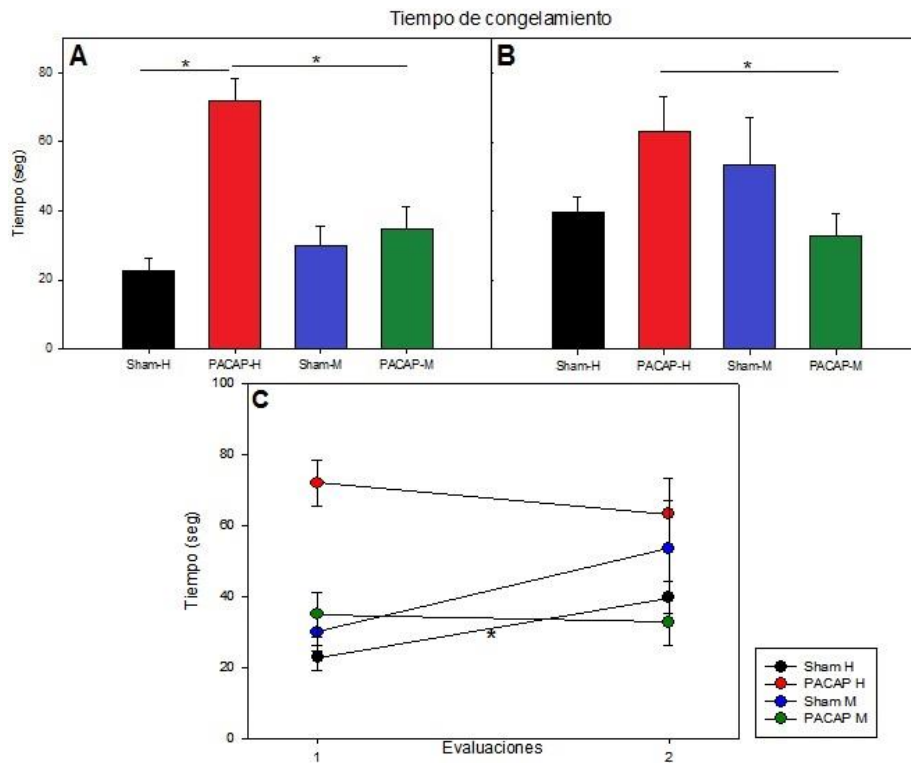


Figura 18. Tiempo de congelamiento en campo abierto. En el panel A se ve la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H ($n=9$) (negro), PACAP H ($n=9$) (rojo), Sham M ($n=8$) (azul), PACAP M ($n=8$) (verde) se encontró una diferencia tanto en los grupos de hembras (sham y PACAP) como entre los grupos PACAP (hembras y machos), esta última se mantiene en la segunda evaluación como se puede observar en el panel B. Por último en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación, que muestra una diferencia en el grupo sham machos. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P < 0.050$).

7.7 La administración de PACAP en CeA no tiene efectos sobre las conductas de afrontamiento al estrés.

El último comportamiento que se comparó fue el acicalamiento tanto frecuencia como tiempo. En cuanto a la frecuencia fue muy similar entre los cuatro grupos en la primera evaluación, mientras que en la segunda evaluación se ve una reducción de la frecuencia en el grupo machos sham y un aumento en la frecuencia de acicalamiento en el grupo machos PACAP sin ser estadísticamente significativo respecto a los demás grupos. Todas estas comparaciones pueden verse en la figura 19.

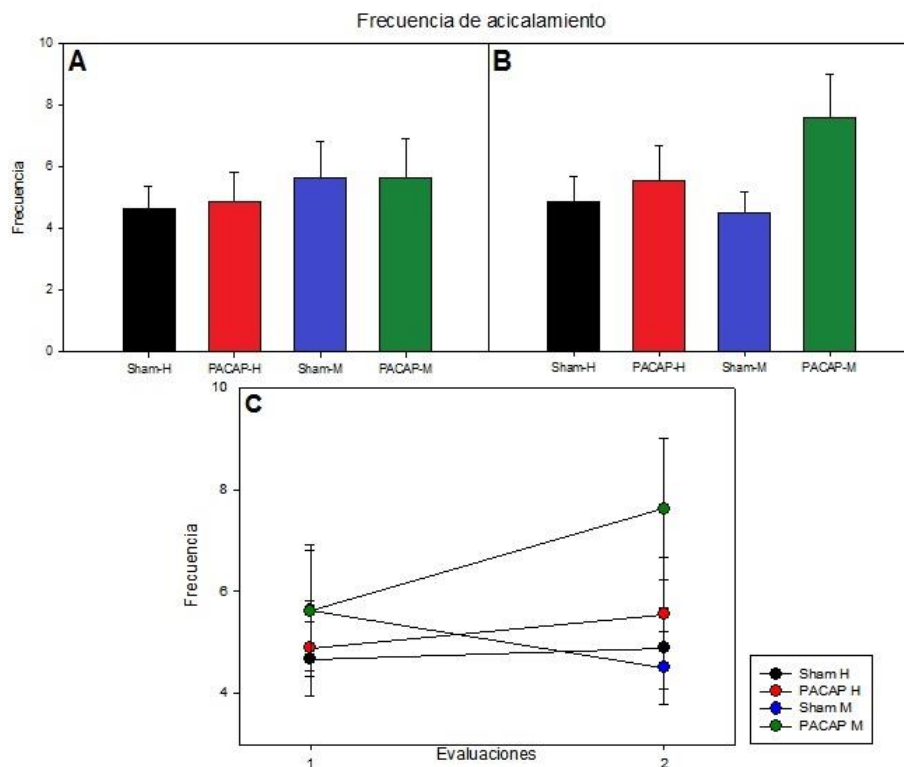


Figura 19. Frecuencia de acicalamiento en campo abierto. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H (n=9) (negro), PACAP H (n=9) (rojo), Sham M (n=8) (azul), PACAP M (n=8) (verde). Mientras que en el panel B se observa la comparación en la segunda evaluación entre los grupos y en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * ($P < 0.050$).

En las comparaciones del tiempo de acicalamiento no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las evaluaciones realizadas, sin embargo, en la primera y

segunda evaluación puede verse que los grupos tratados con PACAP (machos y hembras) pasan mayor tiempo en acicalamiento como se puede ver en la figura 20.

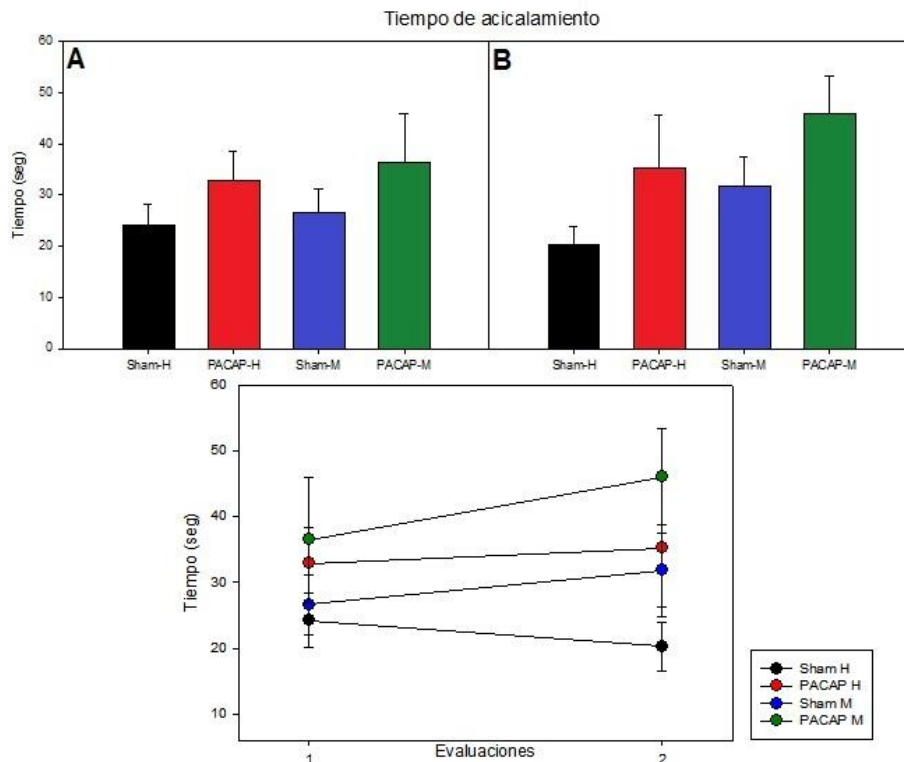


Figura 20. Tiempo de acicalamiento en campo abierto. En el panel A se muestra la comparación en la primera evaluación entre los cuatro grupos: Sham H (n=9) (negro), PACAP H (n=9) (rojo), Sham M (n=8) (azul), PACAP M (n=8) (verde) mientras que en el panel B se observa la comparación en la segunda evaluación entre los grupos y en el panel C se pueden observar las comparaciones intra grupo entre la primera (1) y segunda (2) evaluación. H (Hembras), M (Machos). Las diferencias significativas se representan con el signo: * (P<0.050).

8. Discusión

El presente estudio tuvo como objetivo general evaluar el efecto de la administración de PACAP en la amígdala central sobre conductas tipo ansiedad en machos y hembras. Para lo cual se utilizaron dos paradigmas conductuales ampliamente validados por la literatura (Braun, Skelton, Vorhees, & Williams, 2011; Sestakova, Puzserova, Kluknavsky, & Bernatova, 2013; Tatem et al., 2014) : el laberinto cero elevado y el campo abierto. Ambas pruebas nos permiten observar un conjunto de conductas libres (no condicionadas) y que son susceptibles a variar cuando el sujeto está en un estado ansioso; además, aprovechan la tendencia que tienen los roedores para explorar nuevos espacios y evitar áreas abiertas e iluminadas (Sestakova et al., 2013). Teniendo en consideración esto, los animales fueron sometidos a la evaluación conductual posterior a la administración de PACAP o de vehículo y reevaluados 5 días después para comparar los índices conductuales y observar si había diferencias entre sí.

En el laberinto cero elevado pudimos observar una reducción significativa tanto en el tiempo en brazos abiertos como en los cruces o entradas hacia estos brazos en los grupos tratados con PACAP, esta reducción es un indicador tipo ansiedad ya que por lo general las ratas con un fenotipo ansioso pasan menos tiempo en los brazos abiertos o “inseguros”. Otro aspecto relevante fue que estas diferencias en el comportamiento se mantuvieron en el tiempo, si bien se observa una pequeña reducción, no significativa, del tiempo en brazos abiertos en los 4 grupos, los grupos tratados con PACAP mantienen una media por debajo de los 10 segundos, mientras que los grupos sham son superiores a los 20 segundos. De manera similar el número de entradas o cruces hacia los brazos abiertos se mantienen entre la primera y segunda evaluación. En resumen ambos indicadores aportan evidencia de que

PACAP en la amígdala tiene un efecto ansiogénico duradero y podría ser un mecanismo implicado en la modulación de la respuesta conductual y endocrina al estrés como lo han demostrado otros estudios con otros agentes farmacológicos como el CRH con resultados conductuales similares (Braun et al., 2011).

En el mismo laberinto cero elevado comparamos otro parámetro conductual: la evaluación de riesgo (frecuencia y tiempo), descrita como las aproximaciones de la cabeza o de dos patas del animal hacia afuera de alguno de los brazos abiertos, tanto en frecuencia como en tiempo no encontramos efectos contundentes de PACAP sobre este comportamiento, sin embargo cabe destacar que el grupo sham hembras muestra una mayor frecuencia y tiempo de evaluación de riesgo en las dos evaluaciones. Al respecto se han encontrado diferencias en la ejecución de esta prueba en machos y hembras, donde se observa una mayor movilidad de las ratas hembra en la prueba de laberinto en cruz elevado y una mayor sensibilidad hacia los estresores (Vieira et al., 2018), lo cual se ha relacionado con bajos niveles de estrógenos (estro y metaestro) y con una mayor actividad amigdalina, lo cual podría explicar el aumento en evaluación de riesgo observado en el grupo de hembras sham. Otra posible explicación podría ser que este comportamiento no involucra necesariamente a la señalización de PACAP.

Dada la limitada información que nos aporta la comparación de una sola prueba conductual, la inclusión de dos o más pruebas es pertinente, en el caso de este estudio se incluyó la prueba de campo abierto que nos brinda diversos parámetros tanto de comportamientos tipo ansiedad como de exploración, locomoción, etc. En general en la tarea de campo abierto las ratas con un fenotipo ansioso o de alto estrés tienden a pasar más tiempo en zonas cerradas

o pegadas a las paredes en comparación con los controles, además de mostrar una reducción en la distancia recorrida y un aumento en la conducta de congelamiento (Tatem et al., 2014; Wilson, Grillo, Fadel, & Reagan, 2015).

Con base en esto el primer parámetro a comparar fue el número de cruces totales como una medida de general de motricidad, donde en la primer evaluación observamos que el grupo sham hembras tiene mayor número de cruces y que en la segunda evaluación los dos grupos de hembras tanto sham como experimental muestran una mayor movilidad respecto a los machos, resultados similares han sido reportados con anterioridad (Farhan, Ikram, Kanwal, & Haleem, n.d.; Vieira et al., 2018) donde las hembras, sin ninguna manipulación farmacológica presentan mayor movilidad total en la prueba de campo abierto. Aunque los resultados obtenidos podrían implicar un efecto de PACAP en vías motoras, los resultados observados en los demás parámetros conductuales nos permiten sugerir que lo observado en el número de cruces es producto de un aumento en la ansiedad.

Un par de parámetros, el tiempo y el número de cruces en el centro del campo abierto son indicadores tipo ansiedad, así esperaríamos observar una reducción en el tiempo y los cruces en el centro del campo abierto en los grupos PACAP que fuera consistente a lo hallado en el laberinto cero elevado. Sin embargo como se pudo observar en los resultados esto no sucedió, aunque visualmente en la primera evaluación se aprecia que los grupos sham pasan más tiempo en el centro del campo abierto el efecto no es lo suficientemente grande ni tampoco se sostiene en el tiempo dado que en la segunda evaluación pudimos observar una ejecución similar en los cuatro grupos. Por lo cual podríamos concluir que la presencia de PACAP en amígdala no está relacionada de manera consistente con este

indicador de tipo ansiedad. Un elemento importante de los cruces por el centro fue la comparación intra grupo, ya que se observó una reducción en el número de cruces en los grupos sham, hembras y machos, siendo estos últimos los que mostraron una reducción más evidente, lo cual en general nos podría indicar que los animales son sensibles a la reexposición de estos paradigmas.

El siguiente par de parámetros que comparamos fue la frecuencia y tiempo de erguimiento, un comportamiento que de acuerdo a la literatura se puede interpretar como exploratorio y de evaluación del entorno (Calhoun & Tye, 2015; Sestakova et al., 2013). En cuanto a la frecuencia no se observaron diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las dos evaluaciones, sin embargo la frecuencia de los grupos sham (machos y hembras) se vio reducida en la segunda evaluación de forma significativa, mientras los grupos PACAP su ejecución fue similar entre ambas evaluaciones. En cuanto al tiempo de erguimiento el hecho de observar que los grupos PACAP invierten más tiempo en esta conducta en especial las hembras puede interpretarse de acuerdo a la literatura en ansiedad y en PACAP (Meloni, Venkataraman, Donahue, & Carlezon, 2016; Vieira et al., 2018) que este último sensibiliza al sistema ante posteriores estímulos ansiogénicos, tales como la reexposición al campo abierto, algo totalmente contrario a lo observado en los grupos sham que reducen el tiempo de erguimiento, en especial el grupo sham machos.

El indicador de acicalamiento en tiempo y frecuencia no mostro un efecto significativo o tendencia en general fue muy variable entre los grupos. Este indicador por lo general se le considera un comportamiento de confrontación con el estrés, al no ver un efecto de PACAP en él podría deberse a que su manifestación no dependa de la amígdala ni de PACAP y que

sea más dependiente de núcleos del tronco encefálico y el cerebelo (Kalueff et al., 2016), por lo tanto lo que observamos sea tan inespecífico en lo que respecta a este parámetro conductual.

En cuanto a la comparación de la frecuencia y tiempo de congelamiento, estos fueron los índices que mostraron una mayor diferencia respecto a sus controles. En especial el tiempo de congelamiento que se muestra elevado de manera muy clara en las hembras tratadas con PACAP en la primera y segunda evaluación, esto nos podría indicar un efecto muy específico de PACAP en la conducta de congelamiento y dependiente del sexo, que es coherente con nuestra hipótesis de que el PACAP en CeA tiene un efecto directo en la conducta, algunos estudios de los efectos conductuales con PACAP han mostrado resultados similares en machos (Dore et al., 2013; Legradi et al., 2007; Seiglie, Smith, Blasio, Cottone, & Sabino, 2015), que difieren de nuestros resultados donde el tiempo de congelamiento en los machos tratados con PACAP es similar a los grupos control, si bien estos estudios han tenido diseños similares, las pruebas de evaluación varían entre ellos y con respecto a este estudio.

En resumen tanto las pruebas de laberinto cero elevado como la prueba de campo abierto nos aportaron evidencia del potencial ansiogénico de PACAP en la amígdala los cuales concuerdan con algunos resultados encontrados en otros estudios, por ejemplo la participación de la amígdala en la conducta de congelamiento y en general en comportamientos tipo ansiedad (Legradi et al., 2007; Ventura-Silva et al., 2013) o del aumento en los índices de movilidad en las hembras (Braun et al., 2011; Vieira et al., 2018) con lo cual el objetivo general de la investigación se cumple, sin embargo no se observaron

diferencias consistentes entre machos y hembras tratados con PACAP a excepción de uno de los parámetros que se comparó: el tiempo de congelamiento. De igual forma la comparación de la primera y segunda evaluación mostro resultados similares, con consistencia en el congelamiento en hembras tratadas con PACAP y en la reducción del tiempo y cruces a brazo abierto en ambos grupos tratados con PACAP.

Por último el trabajo comparativo realizado entre machos y hembras en el campo de los modelos animales de ansiedad es altamente relevante por dos aspectos centrales:

El primero de ellos es que los trastornos relacionados con la ansiedad y el estrés tienen una mayor incidencia y son más prevalentes en las mujeres (Medina-Mora Icaza et al., 2005), sin que hasta el momento se hayan identificado las causas que subyacen a su desarrollo y mantenimiento. Para lo cual se han propuesto alternativas farmacológicas basadas en la evidencia clínica de estas enfermedades, uno de los ejemplos es la correlación de PACAP con el TEPT, la ansiedad y depresión (Hammack et al., 2010; Kormos & Gaszner, 2013). Y en esta línea es que este estudio aporta a la descripción de los efectos específicos de PACAP en la conducta.

El segundo aspecto de relevancia es que es necesario establecer paradigmas para el estudio de la ansiedad que sean específicos para las hembras, debido a que la mayoría de los paradigmas existentes se han validado en machos y la extrapolación de estos en hembras no muestran evidencia consistente (conductual y fisiológica) de que en efecto produzcan conductas tipo ansiedad (Dadomo et al., 2018). Por lo cual este estudio aporta evidencia de que es posible inducir efectos ansiogénicos consistente en hembras que podrían ayudarnos a construir modelos más precisos para el estudio de la ansiedad.

Los resultados encontrados en este estudio apoyan la idea de que PACAP es relevante para el despliegue de respuestas de estrés y que la amígdala central es una estructura que juega un papel principal en esta respuesta. Además complementa los estudios hechos en pacientes donde se han encontrado niveles elevados de PACAP en sangre en mujeres diagnosticadas con TEPT, un trastorno que se caracteriza se correlacionan con la severidad de los síntomas intrusivos, de evitación y de hiperalertamiento (Ressler et al., 2011). Y otros que han encontrado que los altos niveles de PACAP en el líquido cefalorraquídeo correlacionan con una alta reactividad de la amígdala y una reducción en la conectividad funcional entre esta y el hipocampo, evaluado mediante fMRI (Stevens et al., 2014). En conjunto la evidencia señala que el PACAP podría ser relevante en el despliegue y mantenimiento de las respuestas del estrés, ansiedad y miedo que tienen como consecuencia desadaptativa el desarrollo diversas patologías. Por otra parte, dada la evidencia antes descrita del papel relevante de la amígdala en el despliegue de estas conductas y de las diferencias que muestran machos y hembras en su expresión de conductas tipo-ansiedad, en este estudio nos interesaba ver si la administración de PACAP en el núcleo central de la amígdala podría tener algún tipo de efecto diferencial en machos y hembras en el grupo de conductas que describimos anteriormente.

9. Conclusiones y limitaciones

Con base en los resultados reportados en esta investigación podemos hacer algunas conclusiones al respecto. En general la administración de PACAP en amígdala tuvo efectos ansiogénicos en la conducta en machos y hembras.

Estos efectos observados pueden resumirse en:

1. PACAP tiene un efecto en el número de entradas hacia los brazos abiertos del laberinto cero elevado en machos y hembras.
2. PACAP reduce el tiempo que pasan los animales en los brazos abiertos del laberinto cero elevado en machos y hembras
3. PACAP aumenta el tiempo de congelamiento de las hembras en campo abierto. Este efecto fue sexo específico y persistió en el tiempo.

Estos efectos específicos observados en cada prueba son consistentes en el tiempo. Y podrían deberse a un aumento en la sensibilidad ante posteriores estímulos “ansiogénicos”.

Sin embargo hay que tomar en consideración algunas limitaciones de este estudio, la más relevante es que esta variabilidad podría ser explicada por otros factores que no se controlaron para este estudio, tales como el ciclo estral de las hembras el cual se ha demostrado que influye en la respuesta de ansiedad y que para futuros estudios se tomara en consideración. Por lo cual se sugiere en futuros experimentos con hembras en diferentes fases del ciclo estral, evaluación de la interacción social y a nivel de circuitos proponemos el estudio del BNST como una parte importante junto con la amígdala del despliegue de conductas de ansiedad moduladas por PACAP.

10. Referencias

- Adhikari, A. (2014). Distributed circuits underlying anxiety. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8 (April), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00112>
- Admon, R., Milad, M. R., & Hendler, T. (2013). A causal model of post-traumatic stress disorder: Disentangling predisposed from acquired neural abnormalities. *Trends in Cognitive Sciences*, 17(7), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.05.005>
- Agarwal, A., Halvorson, L. M., & Legradi, G. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molecular Brain Research*, 138(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>
- Allen, L. S., & Gorski, R. A. (1990). Sex difference in the bed nucleus of the stria terminalis of the human brain. *J Comp Neurol*, 302(4), 697–706. <https://doi.org/10.1002/cne.903020402> [doi]
- Almli, L. M., Mercer, K. B., Kerley, K., Feng, H., Bradley, B., Conneely, K. N., & Ressler, K. J. (2013). ADCYAP1R1 genotype associates with post-traumatic stress symptoms in highly traumatized African-American females. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 162(3), 262–272. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32145>
- Ariza, G. A., De Oliveira, F. L., & Franci, C. R. (2014). Early adolescent stress alters behavior and the HPA axis response in male and female adult rats: The relevance of the nature and duration of the stressor. *Physiology and Behavior*, 133, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.031>
- Bains, J. S., Cusulin, J. I. W., & Inoue, W. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(7), 377–388. <https://doi.org/10.1038/nrn3881>
- Belzung, C., & Griebel, G. (2001). Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. *Behavioural Brain Research*, 125(1–2), 141–149.

[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00291-1)

- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 17(7), 63–79.
[https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Borbély, E., Scheich, B., & Helyes, Z. (2013). Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides*, 47(6), 439–450. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.012>
- Braun, A. A., Skelton, M. R., Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(3), 406–415. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.013>
- Brinks, V., Berger, S., Gass, P., De Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2009). Mineralocorticoid receptors in control of emotional arousal and fear memory. *Hormones and Behavior*, 56(2), 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.05.003>
- Calhoon, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1394–1404. <https://doi.org/10.1038/nn.4101>
- Chattarji, S., Tomar, A., Suvrathan, A., Ghosh, S., & Rahman, M. M. (2015). Neighborhood matters: divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1364–1375. <https://doi.org/10.1038/nn.4115>
- Cho, J.-H., Zushida, K., Shumyatsky, G. P., Carlezon, W. A., Meloni, E. G., & Bolshakov, V. Y. (2012). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Induces Postsynaptically Expressed Potentiation in the Intra-amygdala Circuit. *Journal of Neuroscience*, 32(41), 14165–14177. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1402-12.2012>
- Craske, M. G., Rauch, S. L., Ursano, R., Prenoveau, J., Pine, D. S., & Zinbarg, R. E. (2009). What is an anxiety disorder? *Depression and Anxiety*, 26(12), 1066–1085. <https://doi.org/10.1002/da.20633>
- Cryan, J. F., & Holmes, A. (2005). Model organisms: The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(9), 775–

790. <https://doi.org/10.1038/nrd1825>

Czéh, B., & Fuchs, E. (2016). Remodeling of Neural Networks by Stress. *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress*, 117–126.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00014-5>

Dadomo, H., Gioiosa, L., Cigalotti, J., Ceresini, G., Parmigiani, S., & Palanza, P. (2018). What is stressful for females? Differential effects of unpredictable environmental or social stress in CD1 female mice. *Hormones and Behavior*, 98(August 2017), 22–32. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.11.013>

Dantzer, R. (2016). *Behavior: Overview. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00006-6>

Dedovic, K., Duchesne, A., Andrews, J., Engert, V., & Pruessner, J. C. (2009). The brain and the stress axis: The neural correlates of cortisol regulation in response to stress. *NeuroImage*, 47(3), 864–871. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.074>

Dickson, L., & Finlayson, K. (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology and Therapeutics*, 121(3), 294–316. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.006>

Donahue, R. J., Venkataraman, A., Carroll, F. I., Meloni, E. G., & Carlezon, W. A. (2016). Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide Disrupts Motivation, Social Interaction, and Attention in Male Sprague Dawley Rats. *Biological Psychiatry*, 80(12), 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.06.013>

Dore, R., Iemolo, A., Smith, K. L., Wang, X., Cottone, P., & Sabino, V. (2013). CRF Mediates the Anxiogenic and Anti-Rewarding, But Not the Anorectic Effects of PACAP. *Neuropsychopharmacology*, 38(11), 2160–2169. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.113>

Douma, S. L., Husband, C., O'Donnell, M. E., Barwin, B. N., & Woodend, a K. (2005). Estrogen-related mood disorders: reproductive life cycle factors. *ANS. Advances in Nursing Science*, 28(4), 364–375. <https://doi.org/00012272-200510000-00008> [pii]

- Duvarci, S., & Pare, D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron*, 82(5), 966–980. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.042>
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Cioocchi, S., Herry, C., & Lüthi, A. (2009). Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory. *Neuron*, 62(6), 757–771. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.05.026>
- Eiden, L. E. (2013). *Neuropeptide-catecholamine interactions in stress. Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 68). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411512-5.00018-X>
- Ellis, B. J., & Del Giudice, M. (2014). Beyond allostatic load: Rethinking the role of stress in regulating human development. *Development and Psychopathology*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1017/S0954579413000849>
- Agarwal, A., Halvorson, L. M., & Legradi, G. (2005). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Molecular Brain Research*, 138(1), 45–57. <http://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>
- Bains, J. S., Cusulin, J. I. W., & Inoue, W. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(7), 377–388. <http://doi.org/10.1038/nrn3881>
- Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2008). Chapter 2.4 Defensive behaviors, fear, and anxiety. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 17(7), 63–79. [http://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00005-7](http://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00005-7)
- Braun, A. A., Skelton, M. R., Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: Effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97(3), 406–415. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.09.013>
- Calhoon, G. G., & Tye, K. M. (2015). Resolving the neural circuits of anxiety. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1394–1404. <http://doi.org/10.1038/nn.4101>
- Dadomo, H., Gioiosa, L., Cigalotti, J., Ceresini, G., Parmigiani, S., & Palanza, P. (2018).

- What is stressful for females? Differential effects of unpredictable environmental or social stress in CD1 female mice. *Hormones and Behavior*, 98(August 2017), 22–32. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.11.013>
- Dore, R., Iemolo, A., Smith, K. L., Wang, X., Cottone, P., & Sabino, V. (2013). CRF mediates the anxiogenic and anti-rewarding, but not the anorectic effects of PACAP. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(11), 2160–2169. <http://doi.org/10.1038/npp.2013.113>
- Ennaceur, A. (2014). Tests of unconditioned anxiety - Pitfalls and disappointments. *Physiology and Behavior*, 135, 55–71. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.032>
- Farhan, M., Ikram, H., Kanwal, S., & Haleem, D. J. (n.d.). Unpredictable chronic mild stress induced behavioral deficits : A comparative study in male and female rats, 879–884.
- Gungor, N. Z., Yamamoto, R., & Pare, D. (2015). Optogenetic Study of the Projections From the Bed Nucleus of the Stria Terminalis To the Central Amygdala. *Journal of Neurophysiology*, jn.00677.2015. <http://doi.org/10.1152/jn.00677.2015>
- Hammack, S. E., Roman, C. W., Lezak, K. R., Kocho-Shellenberg, M., Grimmig, B., Falls, W. A., ... May, V. (2010). Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *Journal of Molecular Neuroscience*, 42(3), 327–340. <http://doi.org/10.1007/s12031-010-9364-7>
- Herrmann, M. J., Boehme, S., Becker, M. P. I., Tupak, S. V., Guhn, A., Schmidt, B., ... Straube, T. (2016). Phasic and sustained brain responses in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis during threat anticipation. *Human Brain Mapping*, 37(3). <http://doi.org/10.1002/hbm.23088>
- Imbir, K. K. (2016). From heart to mind and back again. A duality of emotion overview on emotion-cognition interactions. *New Ideas in Psychology*, 43, 39–49. <http://doi.org/10.1016/j.newideapsych.2016.04.001>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C.

- (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 45–59.
<http://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- LeDoux, J. E. (2017). Semantics, Surplus Meaning, and the Science of Fear. *Trends in Cognitive Sciences*, *21*(5), 303–306. <http://doi.org/10.1016/j.tics.2017.02.004>
- Legradi, G., Das, M., Giunta, B., Hirani, K., Mitchell, E. A., & Diamond, D. M. (2007). Microinfusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide into the central nucleus of amygdala of the rat produces a shift from an active to passive mode of coping in the shock-probe fear/defensive burying test. *Neural Plasticity*, *2007*.
<http://doi.org/10.1155/2007/79102>
- McEwen, B. S. (2009). The brain is the central organ of stress and adaptation. *NeuroImage*, *47*(3), 911–913. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.071>
- Meloni, E. G., Venkataraman, A., Donahue, R. J., & Carlezon, W. A. (2016). Bi-directional effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on fear-related behavior and c-Fos expression after fear conditioning in rats. *Psychoneuroendocrinology*, *64*, 12–21. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.11.003>
- Mustafa, T. (2013). *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (pacap). A master regulator in central and peripheral stress responses. Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 68). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-411512-5.00021-X>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (6th editio). Elsevier.
- Seiglie, M. P., Smith, K. L., Blasio, A., Cottone, P., & Sabino, V. (2015). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a depressive-like phenotype in rats. *Psychopharmacology*, *232*(20), 3821–3831. <http://doi.org/10.1007/s00213-015-4045-4>
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., & Bernatova, I. (2013). Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*, *6*(3), 126–135.
<http://doi.org/10.2478/intox-2013-0020>

- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *Journal of Visualized Experiments*, (91), 1–7. <http://doi.org/10.3791/51785>
- Ventura-Silva, A. P., Melo, A., Ferreira, A. C., Carvalho, M. M., Campos, F. L., Sousa, N., & Pêgo, J. M. (2013). Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(April). <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00032>
- Vieira, J. O., Duarte, J. O., Costa-Ferreira, W., Morais-Silva, G., Marin, M. T., & Crestani, C. C. (2018). Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81(August 2017), 426–437. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.014>
- Wilson, M. a., Grillo, C. a., Fadel, J. R., & Reagan, L. P. (2015). Stress as a one-armed bandit: Differential effects of stress paradigms on the morphology, neurochemistry and behavior in the rodent amygdala. *Neurobiology of Stress*, 1, 195–208. <http://doi.org/10.1016/j.ynstr.2015.06.001>
- Ertman, N., Andreano, J. M., & Cahill, L. (2011). Progesterone at encoding predicts subsequent emotional memory. *Learning & Memory*, 18(12), 759–763. <https://doi.org/10.1101/lm.023267.111>
- Farhan, M., Ikram, H., Kanwal, S., & Haleem, D. J. (n.d.). Unpredictable chronic mild stress induced behavioral deficits : A comparative study in male and female rats, 879–884.
- Figiel, M., & Engele, J. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *Journal of Neuroscience*, 20(10), 3596–3605.
- Fink, G. (2016). Stress : Concepts, Definition, History. *Neuroscience and Biobehavioral*

Psychology, 549-555. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02208-2>

- Fink, G. (2016). *Stress, Definitions, Mechanisms, and Effects Outlined: Lessons from Anxiety. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00001-7>
- Fink, G. (2017). Stress Neuroendocrinology: Highlights and Controversies. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*, 2 (February), 1–13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802175-0.00001-2>
- Gafford, G. M., & Ressler, K. J. (2015). GABA and NMDA receptors in CRF neurons have opposing effects in fear acquisition and anxiety in central amygdala vs. bed nucleus of the stria terminalis. *Hormones and Behavior*, 76, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.001>
- Gaszner, B., Kormos, V., Kozicz, T., Hashimoto, H., Reglodi, D., & Helyes, Z. (2012). The behavioral phenotype of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide-deficient mice in anxiety and depression tests is accompanied by blunted c-Fos expression in the bed nucleus of the stria terminalis, central projecting Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience*, 202, 283–299. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.046>
- Gilpin, N. W., Herman, M. A., & Roberto, M. (2015). The Central Amygdala as an Integrative Hub for Anxiety and Alcohol Use Disorders. *Biological Psychiatry*, 77(10), 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.09.008>
- Glover, E. M., Jovanovic, T., & Norrholm, S. D. (2015). Estrogen and extinction of fear memories: Implications for posttraumatic stress disorder treatment. *Biological Psychiatry*, 78(3), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.007>
- Goldstein, J. M., Jerram, M., Abbs, B., Whitfield-Gabrieli, S., & Makris, N. (2010). Sex Differences in Stress Response Circuitry Activation Dependent on Female Hormonal Cycle. *Journal of Neuroscience*, 30(2), 431–438. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3021-09.2010>
- Gruene, T. M., Roberts, E., Thomas, V., Ronzio, A., & Shansky, R. M. (2015). Sex-specific neuroanatomical correlates of fear expression in prefrontal-amygdala circuits.

- Biological Psychiatry*, 78(3), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.014>
- Gungor, N. Z., Yamamoto, R., & Pare, D. (2015). Optogenetic Study of the Projections From the Bed Nucleus of the Stria Terminalis To the Central Amygdala. *Journal of Neurophysiology*, jn.00677.2015. <https://doi.org/10.1152/jn.00677.2015>
- Gunnar, M., & Quevedo, K. (2007). The Neurobiology of Stress and Development. *Annual Review of Psychology*, 58(1), 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.58.110405.085605>
- Pape, H. C., & Pare, D. (2010). Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiology Review*, 90(April), 2010–2011. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2009>.
- Haglund, M. E. M., Nestadt, P. S., Cooper, N. S., Southwick, S. M., & Charney, D. S. (2007). Psychobiological mechanisms of resilience: Relevance to prevention and treatment of stress-related psychopathology. *Development and Psychopathology*, 19(3), 889. <https://doi.org/10.1017/S0954579407000430>
- Hammack, S. E., Cheung, J., Rhodes, K. M., Schutz, K. C., Falls, W. A., Braas, K. M., & May, V. (2009). Chronic stress increases pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST): Roles for PACAP in anxiety-like behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 34(6), 833–843. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.12.013>
- Hammack, S. E., & May, V. (2015). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in stress-related disorders: Data convergence from animal and human studies. *Biological Psychiatry*, 78(3), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.12.003>
- Hammack, S. E., Roman, C. W., Lezak, K. R., Kocho-Shellenberg, M., Grimmig, B., Falls, W. A., ... May, V. (2010). Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *Journal of Molecular Neuroscience*, 42(3), 327–340. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9364-7>

- Hashimoto, H., Shintani, N., Tanaka, K., Mori, W., Hirose, M., Matsuda, T., Baba, A. (2001). Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13355–13360. <https://doi.org/10.1073/pnas.231094498>
- Hashimoto, H., Shintani, N., Tanida, M., Hayata, A., Hashimoto, R., & Baba, A. (2011). PACAP is implicated in the stress axes. *Current Pharmaceutical Design*, 17(10), 985–9. <https://doi.org/10.2174/138161211795589382>
- Hazama, K., Hayata-Takano, A., Uetsuki, K., Kasai, A., Encho, N., Shintani, N., Hashimoto, H. (2014). Increased behavioral and neuronal responses to a hallucinogenic drug in PACAP heterozygous mutant mice. *PLoS ONE*, 9(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089153>
- Herrmann, M. J., Boehme, S., Becker, M. P. I., Tupak, S. V., Guhn, A., Schmidt, B., Straube, T. (2016). Phasic and sustained brain responses in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis during threat anticipation. *Human Brain Mapping*, 37(3), 1091–1102. <https://doi.org/10.1002/hbm.23088>
- Hines, M., Allen, L. S., & Gorski, R. A. (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Research*, 579, 321–326.
- Iemolo, A., Seiglie, M., Blasio, A., Cottone, P., & Sabino, V. (2016). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the central nucleus of the amygdala induces anxiety via melanocortin receptors. *Psychopharmacology*, 233(17), 3269–3277. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4366>
- Imbir, K. K. (2016). From heart to mind and back again. A duality of emotion overview on emotion-cognition interactions. *New Ideas in Psychology*, 43, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.newideapsych.2016.04.001>
- Janak, P. H., & Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517(7534), 284–92. <https://doi.org/10.1038/nature14188>

- Jolivel, V., Basille, M., Aubert, N., de Jouffrey, S., Ancian, P., Le Bigot, J. F., Vaudry, D. (2009). Distribution and functional characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the brain of non-human primates. *Neuroscience*, *160*(2), 434–451. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.028>
- Kalin, N. H., Fox, A. S., Kovner, R., Riedel, M. K., Fekete, E. M., Roseboom, P. H., Oler, J. A. (2016). Overexpressing Corticotropin-Releasing Factor in the Primate Amygdala Increases Anxious Temperament and Alters Its Neural Circuit. *Biological Psychiatry*, *80*(5), 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.01.010>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(1), 45–59. <http://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kormos, V., Gáspár, L., Kovács, L., Farkas, J., Gaszner, T., Csernus, V., Gaszner, B. (2016). Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. *Neuroscience*, *330*, 335–358. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.004>
- Kormos, V., & Gaszner, B. (2013). Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: From animals to humans. *Neuropeptides*, *47*(6), 401–419. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.014>
- Kumar, V., Bhat, Z. A., & Kumar, D. (2013). Animal models of anxiety: A comprehensive review. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *68*(2), 175–183. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.05.003>
- Lebois, L. A. M., Wolff, J. D., & Ressler, K. J. (2016). Neuroimaging genetic approaches to Posttraumatic Stress Disorder. *Experimental Neurology*, *284*, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.019>
- Ledoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* *23*:155–184.
- LeDoux, J. E., & Pine, D. S. (2016). Using neuroscience to help understand fear and

- anxiety: A two-system framework. *American Journal of Psychiatry*, 173(11), 1083–1093. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2016.16030353>
- LeDoux, J. E. (2017). Semantics, Surplus Meaning, and the Science of Fear. *Trends in Cognitive Sciences*, 21(5), 303–306. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.02.004>
- Legradi, G., Das, M., Giunta, B., Hirani, K., Mitchell, E. A., & Diamond, D. M. (2007). Microinfusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide into the central nucleus of amygdala of the rat produces a shift from an active to passive mode of coping in the shock-probe fear/defensive burying test. *Neural Plasticity*, 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/79102>
- Lehmann, M. L., Mustafa, T., Eiden, A. M., Herkenham, M., & Eiden, L. E. (2013). PACAP-deficient mice show attenuated corticosterone secretion and fail to develop depressive behavior during chronic social defeat stress. *Psychoneuroendocrinology*, 38(5), 702–715. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.09.006>
- Lezak, K. R., Roelke, E., Harris, O. M., Choi, I., Edwards, S., Gick, N., ... Hammack, S. E. (2014). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) increases corticosterone in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 45, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.007>
- Li, K., Nakajima, M., Ibañez-Tallon, I., & Heintz, N. (2016). A Cortical Circuit for Sexually Dimorphic Oxytocin-Dependent Anxiety Behaviors. *Cell*, 167(1), 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.067>
- Li, M., Nakamachi, T., & Arimura, A. (2006). Pacap / Vip. *Handbook of Biologically Active Peptides*, 673–81. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369442-3.50097-0>
- Lupien, S. J., Maheu, F., Tu, M., Fiocco, A., & Schramek, T. E. (2007). The effects of stress and stress hormones on human cognition: Implications for the field of brain and cognition. *Brain and Cognition*, 65(3), 209–237. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2007.02.007>

- Maeng, L. Y., & Milad, M. R. (2015). Sex differences in anxiety disorders: Interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Hormones and Behavior*, *76*, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.002>
- Marcondes, F. K., Miguel, K., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiology Behavior*, *74*, 435–440.
- Martin, E. I., Ressler, K. J., Binder, E., & Nemeroff, C. B. (2009). The Neurobiology of Anxiety Disorders: Brain Imaging, Genetics, and Psychoneuroendocrinology. *Psychiatric Clinics of North America*, *32*(3), 549–575. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2009.05.004>
- McEwen, B. S. (2009). The brain is the central organ of stress and adaptation. *NeuroImage*, *47*(3), 911–913. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.05.071>
- McEwen, B. S. (2016). *Central Role of the Brain in Stress and Adaptation: Allostasis, Biological Embedding, and Cumulative Change. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800951-2.00005-4>
- McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1353–1363. <https://doi.org/10.1038/nn.4086>
- McLean, C. P., Asnaani, A., Litz, B. T., & Hofmann, S. G. (2011). Gender differences in anxiety disorders: Prevalence, course of illness, comorbidity and burden of illness. *Journal of Psychiatric Research*, *45*(8), 1027–1035. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.03.006>
- Meloni, E. G., Venkataraman, A., Donahue, R. J., & Carlezon, W. A. (2016). Bi-directional effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on fear-related behavior and c-Fos expression after fear conditioning in rats. *Psychoneuroendocrinology*, *64*, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.11.003>

- Missig, G., Roman, C. W., Vizzard, M. A., Braas, K. M., Hammack, S. E., & May, V. (2014). Parabrachial nucleus (PBN) pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signaling in the amygdala: Implication for the sensory and behavioral effects of pain. *Neuropharmacology*, *86*, 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.06.022>
- Mora, F., Segovia, G., Del Arco, A., De Blas, M., & Garrido, P. (2012). Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Research*, *1476*, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.049>
- Norrholm, S. D., Das, M., & Légrádi, G. (2005). Behavioral effects of local microinfusion of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Regulatory Peptides*, *128*(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.12.023>
- Otto, C., Martin, M., Paul Wolfer, D., Lipp, H. P., Maldonado, R., & Schütz, G. (2001). Altered emotional behavior in PACAP-type-I-receptor-deficient mice. *Molecular Brain Research*, *92*(1–2), 78–84. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00153-X)
- Partridge, J. G., Forcelli, P. A., Luo, R., Cashdan, J. M., Schulkin, J., Valentino, R. J., & Vicini, S. (2016). Stress increases GABAergic neurotransmission in CRF neurons of the central amygdala and bed nucleus stria terminalis. *Neuropharmacology*, *107*, 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.029>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (6th edition). Elsevier.
- Pitts, M. W., & Takahashi, L. K. (2011). The central amygdala nucleus via corticotropin-releasing factor is necessary for time-limited consolidation processing but not storage of contextual fear memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *95*(1), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2010.11.006>
- Ressler, K. J., Mercer, K. B., Bradley, B., Jovanovic, T., Mahan, A., Kerley, K., ... May, V. (2011). Post-traumatic stress disorder is associated with PACAP and the PAC1 receptor. *Nature*, *470*(7335), 492–497. <https://doi.org/10.1038/nature09856>

- Rhudy, J. L., & Meagher, M. W. (2000). Fear and anxiety: Divergent effects on human pain thresholds. *Pain*, *84*(1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00183-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00183-9)
- Roozendaal, B., Koolhaas, J. M., & Bohus, B. (1991). Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. *Physiology and Behavior*, *50*(4), 777–781. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90017-I](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90017-I)
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 423–433. <https://doi.org/10.1038/nrn2651>
- Rudecki, A. P., & Gray, S. L. (2016). PACAP in the Defense of Energy Homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *27*(9), 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.04.008>
- Schiller, D., Levy, I., Niv, Y., LeDoux, J. E., & Phelps, E. A. (2008). From Fear to Safety and Back: Reversal of Fear in the Human Brain. *Journal of Neuroscience*, *28*(45), 11517–11525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2265-08.2008>
- Schmidt, S. D., Myskiw, J. C., Furini, C. R. G., Schmidt, B. E., Cavalcante, L. E., & Izquierdo, I. (2015). PACAP modulates the consolidation and extinction of the contextual fear conditioning through NMDA receptors. *Neurobiology of Learning and Memory*, *118*, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.014>
- Seiglie, M. P., Smith, K. L., Blasio, A., Cottone, P., & Sabino, V. (2015). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a depressive-like phenotype in rats. *Psychopharmacology*, *232*(20), 3821–3831. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4045-4>
- Sestakova, N., Puzserova, A., Kluknavsky, M., & Bernatova, I. (2013). Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*, *6*(3), 126–135. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0020>
- Shen, S., Gehlert, D. R., & Collier, D. A. (2013). PACAP and PAC1 receptor in brain development and behavior. *Neuropeptides*, *47*(6), 421–430. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.005>

- Shepard, J. D., Barron, K. W., & Myers, D. A. (2000). Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Research*, *861*(2), 288–295.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02019-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02019-9)
- Shepard, J. D., Barron, K. W., & Myers, D. A. (2003). Stereotaxic localization of corticosterone to the amygdala enhances hypothalamo-pituitary – adrenal responses to behavioral stress. *Thymus*, *963*, 203–213.
- Sherin, J. E., & Nemeroff, C. B. (2011). Post-traumatic stress disorder: The neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *13*(3), 263–278.
- Shin, L. M., & Liberzon, I. (2010). The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 169–191.
<https://doi.org/10.1038/npp.2009.83>
- Solomon, M. B., & Herman, J. P. (2009). Sex differences in psychopathology: Of gonads, adrenals and mental illness. *Physiology and Behavior*, *97*(2), 250–258.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.033>
- Sorrells, S. F., Caso, J. R., Munhoz, C. D., & Sapolsky, R. M. (2009). The Stressed CNS: When Glucocorticoids Aggravate Inflammation. *Neuron*, *64*(1), 33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.032>
- Stamatakis, A. M., Sparta, D. R., Jennings, J. H., Mcelligott, Z. A., Decot, H., & Stuber, G. D. (2014). Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis circuitry: Implications for addiction-related behaviors. *Neuropharmacology*, *76*(PART B), 320–328.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.046>
- Stevens, J. S., Almlil, L. M., Fani, N., Gutman, D. A., Bradley, B., Norrholm, S. D., Ressler, K. J. (2014). PACAP receptor gene polymorphism impacts fear responses in the amygdala and hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(8), 3158–3163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318954111>
- Stroth, N., Holighaus, Y., Ait-Ali, D., & Eiden, L. E. (2011). PACAP: A master regulator of neuroendocrine stress circuits and the cellular stress response. *Annals of the New*

York Academy of Sciences, 1220(1), 49–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.05904.x>

- Stroth, N., Liu, Y., Aguilera, G., & Eiden, L. E. (2011). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Controls Stimulus-Transcription Coupling in the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis to Mediate Sustained Hormone Secretion During Stress. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(10), 944–955. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02202.x>
- Sylvers, P., Lilienfeld, S. O., & LaPrairie, J. L. (2011). Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology. *Clinical Psychology Review*, 31(1), 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2010.08.004>
- Tanida, M., Shintani, N., Morita, Y., Tsukiyama, N., Hatanaka, M., Hashimoto, H., Nagai, K. (2010). Regulation of autonomic nerve activities by central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Regulatory Peptides*, 161(1–3), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.02.002>
- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *Journal of Visualized Experiments*, (91), 1–7. <https://doi.org/10.3791/51785>
- Telegdy, G., & Adamik, A. (2015). Neurotransmitter-mediated anxiogenic action of PACAP-38 in rats. *Behavioural Brain Research*, 281, 333–338s. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.039>
- Tovote, P., Fadok, J. P., & Lüthi, A. (2015). Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(6), 317–331. <https://doi.org/10.1038/nrn3945>
- Uddin, M., Chang, S.-C., Zhang, C., Ressler, K., Mercer, K. B., Galea, S., ... Koenen, K. C. (2013). *ADCYAP1R1* genotype posttraumatic stress disorder and depression among women exposed to childhood maltreatment. *Depression and Anxiety*, 30(3), 251–258. <https://doi.org/10.1002/da.22037>
- Vaudry, D., Falluel-morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Sante, D.

- (2009). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors : 20 Years after the Discovery. *Peptide Research*, 61(3), 283–357.
<https://doi.org/10.1124/pr.109.001370.283>
- Vaudry, D., Nakamachi, T., A., Basille. M., Wurtz, O., Fournier, A., Vaudry, H., & Shoida, S. (2013). Pacap. *Handbook of Biologically Active Peptides*. Vol 38.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00119-6>
- Ventura-Silva, A. P., Melo, A., Ferreira, A. C., Carvalho, M. M., Campos, F. L., Sousa, N., & Pêgo, J. M. (2013). Excitotoxic lesions in the central nucleus of the amygdala attenuate stress-induced anxiety behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7(April). <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00032>
- Vieira, J. O., Duarte, J. O., Costa-Ferreira, W., Morais-Silva, G., Marin, M. T., & Crestani, C. C. (2018). Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 81(August 2017), 426–437.
<http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.014>
- Walker, C. S., Sundrum, T., & Hay, D. L. (2014). PACAP receptor pharmacology and agonist bias: Analysis in primary neurons and glia from the trigeminal ganglia and transfected cells. *British Journal of Pharmacology*, 171(6), 1521–1533.
<https://doi.org/10.1111/bph.12541>
- Wang, L., Cao, C., Wang, R., Qing, Y., Zhang, J., & Zhang, X. Y. (2013). PAC1 receptor (ADCYAP1R1) genotype is associated with PTSD's emotional numbing symptoms in Chinese earthquake survivors. *Journal of Affective Disorders*, 150(1), 156–159.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.01.010>
- Wilson, M. a., Grillo, C. a., Fadel, J. R., & Reagan, L. P. (2015). Stress as a one-armed bandit: Differential effects of stress paradigms on the morphology, neurochemistry and behavior in the rodent amygdala. *Neurobiology of Stress*, 1, 195–208.
<http://doi.org/10.1016/j.ynstr.2015.06.001>